

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
ALEXANDRE MELANÇON**

**AUGMENTATION DE LA DENSITÉ DES RÉCEPTEURS HÉPATIQUES AU
GLUCAGON INDUITE PAR UNE PÉRIODE DE JEUNE ET D'EXERCICE**

FÉVRIER 2005

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Il est évident qu'un projet de l'envergure de celui réalisé lors de mon cheminement de maîtrise ne s'accomplit pas seul. Je me considère privilégié d'avoir eu la chance de côtoyer des gens aussi professionnels et dévoués. En la personne de Martin Milot, je n'ai pas seulement découvert un professionnel de recherche passionné et compétent mais également un ami qui s'est investi entièrement avec moi dans la réussite de ce projet. Malheureusement, bien que nos chemins aient pris des directions différentes, je suis persuadé que tu accompliras de grandes choses. Bonne chance.....

Tout au long de mon cheminement, il m'a été donné de travailler en collaboration avec des étudiants partageant les mêmes objectifs. Geneviève, Marie-Claude, Elaine, Mathieu et Anis, merci pour les nombreuses discussions animées, vos présences pendant les périodes plus difficiles ainsi que votre support autant du point de vue technique qu'humain m'ont grandement facilité la tâche.

Mes remerciements ne sauraient être complets sans mentionner Mme Rollande Caron, animalière de l'UQTR. Tes conseils techniques et surtout ton soutien moral ont été et sont grandement appréciés.

Je voudrais également mentionner l'apport du CRSNG pour les subventions qui ont permis la réalisation de ce travail.

Finalement, j'aimerais évidemment remercier mon directeur de projet, Mme Carole Lavoie Ph.D. Merci Carole dans un premier temps de m'avoir donné la possibilité de faire des études graduées au sein de ton équipe, mais surtout merci pour ton soutien de tous les instants, ton accessibilité et ta compréhension. Merci également de m'avoir transmis ton engouement pour la recherche scientifique, je me sens choyé d'avoir été en mesure de réaliser un tel cheminement à tes côtés. En espérant que j'aurai le privilège de faire de nouveau équipe avec toi....

RÉSUMÉ

Légaré et col. (2001) ont montré que les changements de la sensibilité hépatique au glucagon induits par l'entraînement en endurance, observés par Drouin et col. (1998), pouvaient s'expliquer, en partie par des modifications de la densité des récepteurs au glucagon. Récemment, Bonjorn et col. (2002) ont observé qu'une seule période d'exercice augmentait aussi la sensibilité du foie à l'action du glucagon. L'objectif du présent projet était de caractériser les effets d'une stimulation aiguë et ponctuelle sur les propriétés de liaison des récepteurs au glucagon. Spécifiquement, nous avons mesuré l'affinité (K_d) et la densité (B_{max}) des récepteurs hépatiques au glucagon suite à un épisode de jeûne complet de 24 heures et suite à une période d'exercice d'une durée de 180 minutes.

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été aléatoirement assignés à un groupe contrôle maintenu au repos et nourris, ($n = 7$), jeûne (24 heures de jeûne complet, $n = 7$) et exercice (nourris et 180 minutes de nage, $n = 7$). Aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la glycémie entre les animaux contrôles, à jeun et à l'exercice ($7,4 \pm 0,8$; $7,7 \pm 0,4$; et $8,1 \pm 0,5$ mmol/L, respectivement) malgré une diminution marquée de la concentration de glycogène hépatique chez les groupes jeûne et exercice comparativement au groupe contrôle (921 ± 48 ; 76 ± 8 ; et 128 ± 28 μ mol unités glycosyl / g poids sec, respectivement).

Une période de jeûne ou d'exercice entraîne une augmentation de la densité des récepteurs au glucagon de l'ordre de 159 ± 21 % et 165 ± 9 % respectivement, lorsque comparés à la densité des récepteurs des animaux contrôles. Au niveau de l'affinité du glucagon pour son récepteur hépatique, aucune variation significative n'a été observée chez le groupe exercice alors que le groupe jeûne a subi une diminution de 41 ± 22 % comparativement au groupe contrôle.

En conclusion, ces résultats indiquent : 1) que le récepteur au glucagon peut être modulé rapidement soit par 24 heures en situation de jeûne ou par 180 minutes d'exercice, et 2) que la hausse de la sensibilité au glucagon observée chez des animaux suite à une seule période d'exercice provient, du moins en partie, de la hausse de la densité des récepteurs au glucagon.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS(ES)

La contribution des co-auteurs(es) s'est étendue de la mise sur pied du projet, en passant par la réalisation et par l'interprétation des données recueillies. Le professionnel de recherche Martin Milot m'a permis de me familiariser avec les différents équipements et fut également d'une aide précieuse lors de la mise au point des techniques nécessaires à la réalisation de ce projet.

Pour leur part, les docteurs D. Massicotte et F. Péronnet ont participé à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction de l'article scientifique associé à ce projet.

Ma directrice de recherche, docteure Carole Lavoie, directrice du laboratoire de biochimie de l'exercice, a participé à chacune des étapes de ce projet. En passant par les demandes de subventions, l'élaboration d'un plan de travail, l'interprétation des résultats et la correction du rapport écrit et de l'article scientifique, le docteur Lavoie a supervisé chacune des étapes nécessaires à la réalisation de ce projet.

Pour ma part, j'ai participé à la mise sur pied du projet d'un point de vue technique, j'ai également réalisé les principales manipulations techniques menant aux différents résultats. Finalement, après avoir participé à l'analyse des résultats, j'ai formulé les bases et rédigé le présent mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS(ES).....	IV
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	X
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION	1
1.1 Métabolisme	1
1.2 Le glucagon	6
1.2.1 Glucagon et jeûne	7
1.2.2 Glucagon et exercice.....	9
1.3 Le récepteur au glucagon	10
1.3.1 Caractérisation du récepteur	13
1.3.2 Récepteur au glucagon et jeûne	16
1.3.3 Récepteur au glucagon et l'exercice	17
1.4 Problématique.....	18
CHAPITRE 2	
MÉTHODOLOGIE	19
2.1 Procédures expérimentales	19
2.1.1 Animaux.....	19
2.1.2 Jeûne	19
2.1.3 Exercice	19
2.1.4 Sacrifice et échantillonnage des tissus.....	20
2.1.5 Isolation des membranes plasmiques des hépatocytes	20
2.1.6 Radiolisation	21
2.2 Analyses	23
2.2.1 Glycogène	23
2.2.2 Glucose	24
2.2.3 Glucagon et insuline	24
2.3 Statistiques.....	24

CHAPITRE 3

RÉSULTATS.....	25
3.1 Données descriptives	25
3.2 Métabolites et substrats glucidiques.....	26
3.3 Hormones	28
3.4 propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon	29

CHAPITRE 4

DISCUSSION	33
4.1 Techniques utilisées	33
4.2 Effet du jeûne	35
4.3 Effet de l'exercice	37
4.4 Mécanismes régulateurs	39
4.5 Perspectives de recherche.....	43
4.6 Conclusion.....	44
BIBLIOGRAPHIE.....	45

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1.1	Schéma de la régulation du métabolisme glucidique en réponse à une baisse de glycémie	2
1.2	Représentation biochimique menant à la synthèse de glycogène via la néoglucogenèse.	4
1.3	Balance de la production hépatique de glucose en fonction de la glycémie chez le chien.	5
1.4	Augmentation de la glucagonémie en fonction de la durée d'un jeûne.	8
1.5	Variation de la glucagonémie à l'exercice selon 3 différents sites de prélèvement	11
1.6	Distribution et expression de l'ARNm associé au récepteur au glucagon chez le rat.	12
1.7	Représentation des structures primaires et secondaires du récepteur hépatique au glucagon chez le rat.	14
1.8	Activation intracellulaire du récepteur au glucagon.	15
1.9	Exemple type d'une courbe de saturation.	17
2.1	Représentation schématique de la préparation de membranes plasmiques des hépatocytes.	22
3.1	Concentration totale de glycogène hépatique des groupes contrôle, jeûne et exercice.	28
3.2	Concentrations plasmatiques d'insuline de glucagon et ratio glucagon/insuline des groupes contrôle, jeûne et exercice.	29
3.3	Propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon sous forme de courbes de saturation (a) et sous forme de représentation Scatchard (b) chez les groupes contrôle, jeûne et exercice.	31
4.1	Récupération du glucagon avec ou sans albumine sérique humaine.	36

4.2 Production de glucose suite à une infusion de glucagon.

39

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titre	Page
3.1	Poids des animaux le matin du sacrifice	25
3.2	Variation de poids des animaux dans les 24 heures précédant le sacrifice.	26
3.3	Ratio masse hépatique/masse corporelle suite à 24 heures de jeûne.	26
3.4	Concentrations plasmatiques de glucose, β -hydroxybutyrate et lactate.	27
3.5	Propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon.	32
4.1	Distribution des marqueurs membranaires enzymatiques.	34

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

AMPC	:	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
Bmax	:	Nombre de sites de liaison (densité des récepteurs)
GLP-1	:	« Glucagon like peptide 1 »
GLP-2	:	« Glucagon like peptide2 »
GPK	:	Glycogène phosphorylase kinase
IP ₃	:	Inositol 1,4,5-triphosphate
Kd	:	Constante de dissociation (affinité des récepteurs)
PEP	:	Phosphoénolpyruvate
PEPCK	:	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PHG	:	Production hépatique de glucose
PKA	:	Protéine kinase A
RHG	:	Récepteur hépatique au glucagon

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Métabolisme glucidique

La consommation moyenne de calories chez les Nord-Américains est composée de 40-45 % de glucides, 40 % de lipides et 15-20 % de protéines. La composition de nos réserves énergétiques est cependant bien différente de notre diète. La valeur calorique des glucides emmagasinés sous forme de glycogène dans tout l'organisme soit dans le foie (70 g), les muscles (200 g) et le sang (20 g) correspond à environ 1100 kilocalories ce qui est bien en-dessous des besoins quotidiens et ce, même au repos (85).

Les glucides sont utilisés par les cellules afin de produire l'énergie nécessaire à la réalisation des différents processus physiologiques. De manière à être métabolisés par les cellules, les glucides doivent être convertis en glucose. Le glucose ($C_6H_{12}O_6$) est un monosaccharide qui est véhiculé via le sang vers les cellules de notre organisme afin de répondre aux différents besoins énergétiques. En période de repos, le glucose peut être mis sous forme de réserve appelée glycogène. Les réserves de glycogène se situent principalement au niveau des hépatocytes ainsi que des cellules musculaires. Le glycogène emmagasiné au niveau du foie peut être catabolisé de nouveau en glucose pour se diriger vers la circulation sanguine en réponse à une baisse de la concentration glucidique dans le sang (figure 1.1).

Le foie, source endogène principale de glycogène (13), produit du glucose suite à une baisse de l'apport extrinsèque de glucides ou à une hausse des besoins énergétiques de l'organisme, la production de glucose résulte de deux procédés soient la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Cependant, dans la littérature, on considère de plus en plus l'importance des reins dans la production endogène de glucose. Selon Stumvoll et col. (72) les reins peuvent contribuer jusqu'à 10 % de la production endogène de glucose. La production rénale de glucose est exclusivement sous la responsabilité de la néoglucogenèse due à l'absence de réserve de glycogène au niveau des reins.

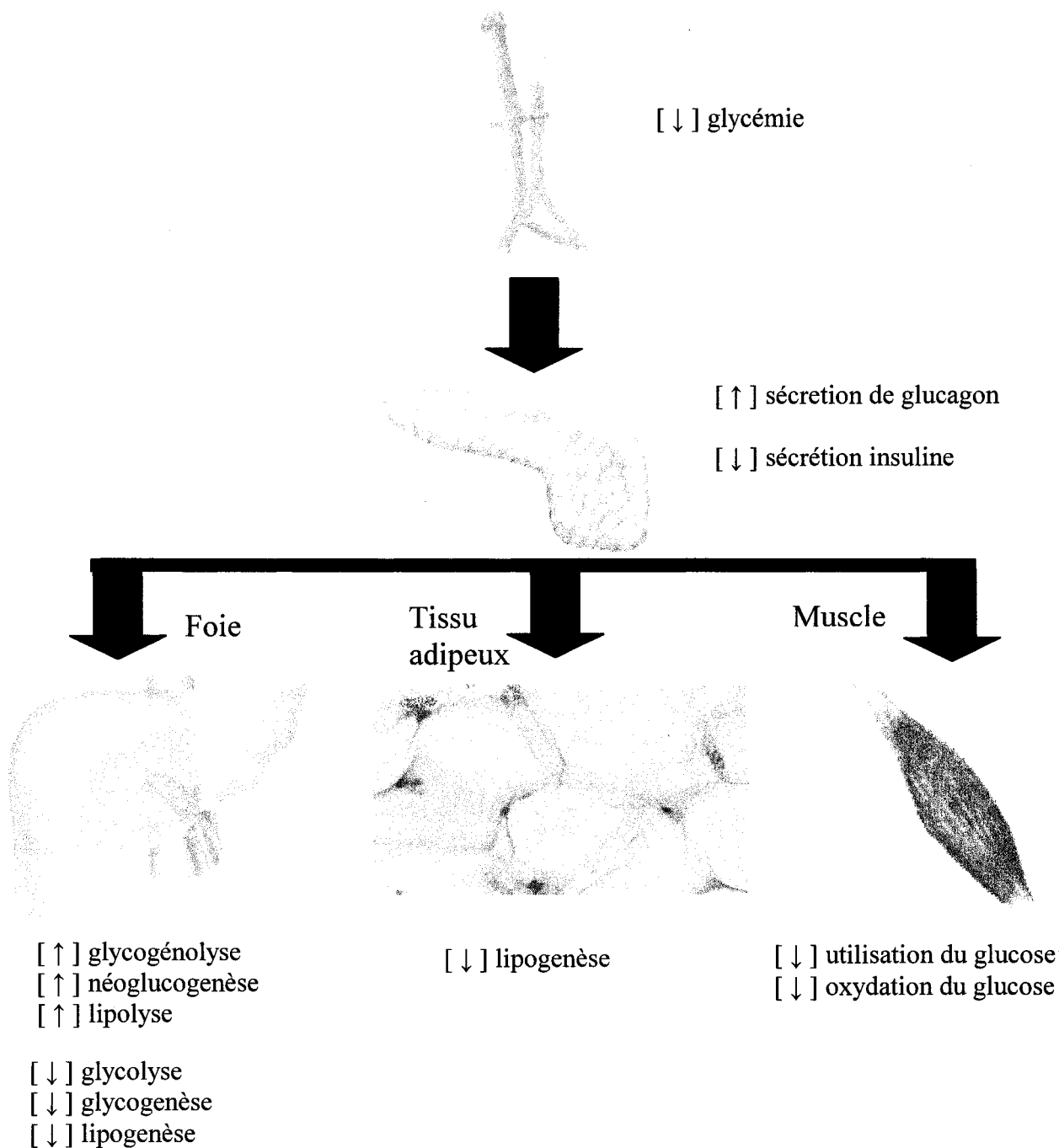


FIGURE 1.1 : Schéma de la régulation du métabolisme glucidique en réponse à une baisse de glycémie.

Lors des premiers instants d'une période d'exercice physique, la production hépatique de glucose (PHG) est majoritairement sous la responsabilité de la

glycogénolyse (2, 81). Ce phénomène est également retrouvé en période de jeûne où la glycogénolyse est la principale source de la production de glucose jusqu'à épuisement des réserves glucidiques soit pendant les 20 à 40 premières heures (37). Cependant, lors d'une période prolongée d'exercice ou de jeûne, l'augmentation de la néoglucogenèse est le principal facteur responsable du maintien ou de l'augmentation de la production de glucose (43, 80, 83).

La glycogénolyse est un processus qui implique la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate qui, lorsqu'il est isomérisé en glucose-6-phosphate, pourra être déphosphorylé, libéré et métabolisé par les cellules selon leurs besoins respectifs.

La néoglucogenèse est un procédé permettant la synthèse de glucose à partir de précurseurs non-glucidiques et est principalement sous le contrôle des hormones pancréatiques que sont l'insuline et le glucagon (35, 61). Les principaux précurseurs utilisés pour la synthèse de 'nouveau' glucose doivent dans un premier temps être convertis en pyruvate qui est le substrat de premier ordre dans la cascade biochimique de la néoglucogenèse (figure 1.2).

La réponse adéquate de la PHG est prépondérante au maintien de l'homéostasie glucidique. Afin de répondre rapidement aux changements des besoins en glucides de l'organisme, l'efficacité de la PHG repose sur une double régulation. Cette double régulation consiste en une régulation non-hormonale et une régulation hormonale. La régulation non-hormonale de la PHG, aussi connue sous le nom d'autorégulation, suggère que le foie modifie sa production de glucose selon la glycémie de son environnement (71). Le phénomène d'autorégulation joue un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose hépatique. Récemment, une étude effectuée chez le chien a démontré que la production hépatique de glucose est inversement proportionnelle à la concentration de glucose plasmatique (figure 1.3). En présence de concentrations basales d'insuline et de glucagon, un épisode d'hyperglycémie peut faire chuter la PHG de l'ordre de 60 à 90% (56).

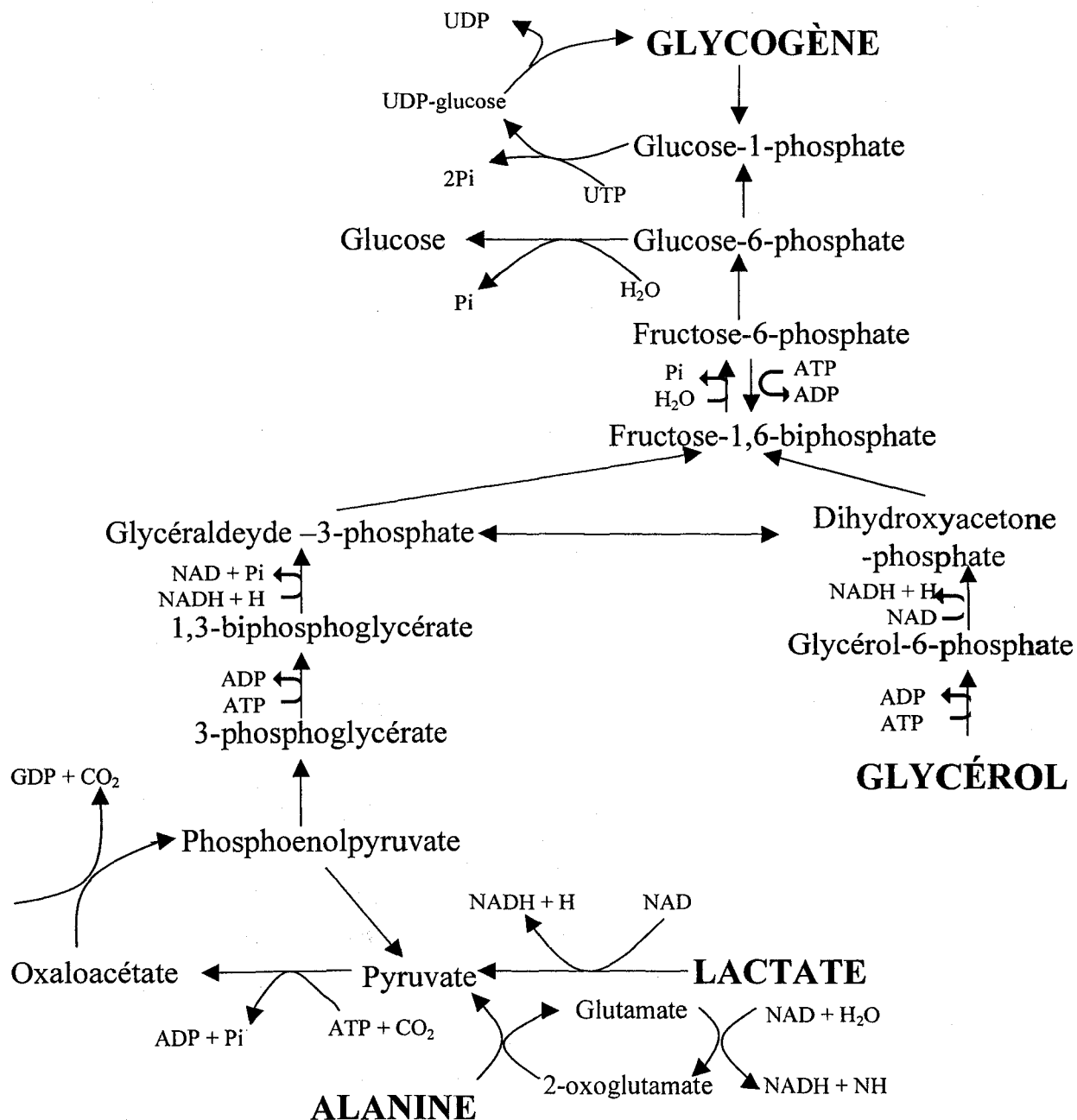


FIGURE 1.2 : Représentation biochimique menant à la synthèse de glycogène via la néoglucogenèse. Adaptée de : Murray et col. 2002, Houston 2001.

Lors de l'étude de Moore et col. (56), les chiens ont été infusés, dans un premier temps, à la somatostatine afin d'inhiber la sécrétion d'hormones pancréatiques. Par la suite des quantités basales d'insuline et de glucagon ont été perfusées ainsi qu'une concentration de glucose permettant une augmentation de la glycémie au-dessus des valeurs normales (> 9 mmol/L). Suite à cette seconde perfusion, la PHG a diminué significativement après seulement 15 minutes montrant ainsi l'implication rapide du phénomène d'autorégulation dans le maintien de l'homéostasie glucidique.

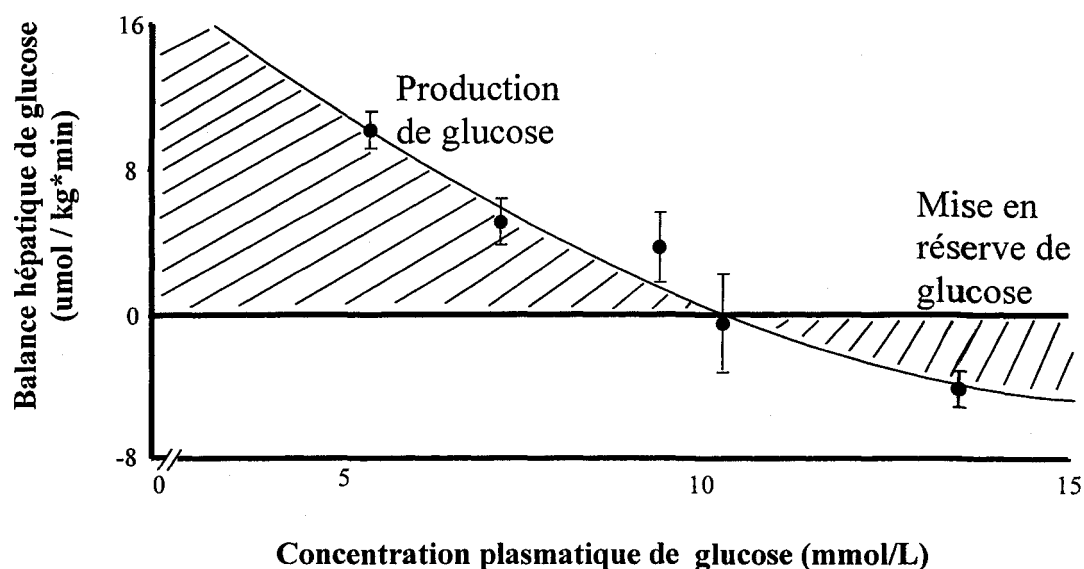


FIGURE 1.3 : Balance de la production hépatique de glucose en fonction de la glycémie chez le chien. Adaptée de : Moore et col. 1998.

Malgré la participation non négligeable de l'autorégulation dans la régulation de la production hépatique de glucose, le facteur le plus déterminant semble être associé à l'effet des hormones pancréatiques que sont l'insuline et le glucagon. La suppression de la PHG par l'insuline est très bien documentée (6, 7, 24). De plus, selon Igawa et col. (31), l'effet de stimulation du glucagon sur la PHG est potentialisé par la baisse de la concentration de l'insuline. Le glucagon, qui a longtemps été considéré comme le parent

pauvre de l'homéostasie glucidique, est depuis quelque temps l'objet de recherches intensives suite à la découverte de son rôle non-négligeable dans le diabète de type 2 (20).

1.2 Le glucagon

Le proglucagon est composé de 180 acides aminés et sa protéolyse résulte en la synthèse de trois différentes hormones soient le glucagon, le GLP-1 (glucagon like peptide-1) et le GLP-2 (glucagon like peptide-2) (50). Le glucagon est une hormone peptidique composée de 29 acides aminés libérés par les cellules alpha des îlots de Langerhans en réponse à une baisse de la concentration de glucose dans le sang (32). Le rôle principal du glucagon est de maintenir une normoglycémie en tenant compte des besoins physiologiques de l'organisme. Le glucagon est également impliqué dans la prévention d'évènements hypoglycémiques en stimulant la glycogénolyse et la néoglucogénèse et en inhibant la glycolyse (figure 1.1). Bien que longtemps considéré comme le parent pauvre de l'homéostasie glucidique, le glucagon est de plus en plus l'objet d'études et considéré dans les traitements potentiels des pathologies glucidiques tel que le diabète de type 2. Il semble de plus en plus évident qu'un pourcentage important des complications métaboliques associées au diabète de type 2 pourraient être en partie dues à une augmentation anormale de l'activité du glucagon (68, 75, 76). Au contraire, son déficit et/ou la perte de la réponse au glucagon dans le diabète de type 1, rend vulnérable la correction des hypoglycémies (14).

Globalement, le glucagon favorise la glycogénolyse en activant, via son récepteur, la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle et active l'enzyme glycogène phosphorylase kinase (GPK). Cette dernière enzyme catalyse l'enlèvement du résidu glucose terminal de la molécule de glycogène présent dans la cellule, permettant le catabolisme du glycogène ce qui induit la production du glucose-1-phosphate (55). Le glucagon agit également au niveau de la glucose-6-phosphatase en augmentant son activité favorisant par le fait même une meilleure conversion du glucose-6-phosphate en

glucose. Le glucagon potentialise également la néoglucogenèse en stimulant l'activité de l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). La PEPCK catalyse la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate (PEP), étape limitante de la production de glucose via la néoglucogenèse.

Contrairement à l'insuline qui agit sur une multitude de tissus, le glucagon agit de façon beaucoup plus centralisée au niveau du foie, du cœur et du tractus digestif (26).

1.2.1 Glucagon et jeûne

En période de jeûne, le système endocrinien intervient de manière à conserver une normoglycémie tout en soutenant les besoins des différents tissus et en minimisant le catabolisme protéique de l'organisme. Les fluctuations hormonales observées lors d'un jeûne ont comme principaux objectifs une augmentation de la néoglucogenèse et de la lipolyse, et dans des cas plus extrêmes, une augmentation de la cétogenèse. Bien que la diminution de la concentration de l'insuline en association avec une augmentation de la concentration de glucagon soit en grande partie responsable de la mobilisation des substrats nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme (31), l'implication du système endocrinien ne se limite pas qu'à ces deux hormones. Une augmentation de la concentration plasmatique de l'hormone de croissance et des catécholamines ainsi qu'une diminution du cortisol et de la triiodothyronine ont également été observées en période de privation nutritionnelle. Cependant, le rôle de l'hormone de croissance (GH), du cortisol, des catécholamines et de la triiodothyronine (T3) dans le contrôle de l'homéostasie glucidique semble être plus secondaire lorsque comparé à l'insuline et au glucagon (19).

Il existe dans la littérature, plusieurs études confirmant l'importance du glucagon dans le maintien de l'homéostasie glucidique en période de jeûne (3, 11, 27, 46). La concentration plasmatique de glucagon augmente en fonction de la durée de la période de jeûne (28) permettant ainsi à l'organisme de maintenir une glycémie constante et adéquate lors d'un jeûne prolongé (figure 1.4). Ce maintien de l'homéostasie glucidique

se manifeste en période de jeûne par une augmentation significative de la néoglucogenèse dans la production hépatique de glucose induite principalement par le glucagon (4, 11, 37, 47, 66).

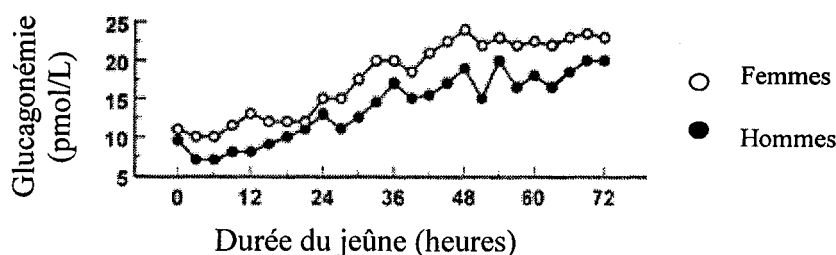


FIGURE 1.4 : Augmentation de la glucagonémie en fonction de la durée d'un jeûne. Adaptée de : Hojlund et col., 2001.

Certaines pathologies tel que le diabète, peuvent entraînées des épisodes d'hypoglycémies associés au jeûne qui sont généralement accompagnés d'une absence de la hausse de la concentration plasmatique de glucagon (10, 37). Cette absence d'augmentation du glucagon diminue la contribution de la néoglucogenèse, phénomène grandement responsable du maintien de la glycémie suite à la déplétion des réserves de glycogène hépatique observée lors d'un jeûne.

La littérature fait également état d'un autre type de jeûne souvent appelé malnutrition chronique (74). Le jeûne complet implique une déplétion des réserves de glycogène et une augmentation de la cétogenèse, de la néoglucogenèse et de la lipolyse alors qu'en situation de malnutrition chronique, les processus de glyco-génolyse et de formation de corps cétoniques demeurent sensiblement au même niveau (65). Dans le jeûne complet chez le rat, une perte de poids importante variant de -6 à -9 % s'observe suite à un jeûne de 36 heures (87). En comparaison, un rat nourrit *ad libitum* voit son poids augmenter de 0,9 % par jour et un rat soumis à une restriction alimentaire calorique de 30 % subit une hausse de poids de seulement 0,2 %/jour (25). Enfin, le

jeûne implique une situation de catabolisme importante ce qui n'est pas le cas de la malnutrition chronique.

1.2.2 Glucagon et exercice

En situation d'exercice physique, la concentration de glucagon plasmatique augmente de manière plus ou moins importante en fonction du site des prélèvements sanguins (82). L'absence de l'augmentation de la concentration du glucagon en périphérie s'explique par un gradient de concentration du glucagon plasmatique pouvant atteindre une concentration portale 10 fois plus élevée que la concentration périphérique (figure 1.5).

Le caractère invasif de l'accès portal chez l'homme réduirait l'importance du rôle du glucagon à l'exercice. Néanmoins, Lavoie et col. (44) ont observé chez l'homme, que la PHG, ainsi que la néoglucogénèse, doublent suite à une seule période d'exercice (2 heures à 40 % du VO_2max) et qu'un déficit en glucagon à l'exercice ne permet pas ces augmentations. Cette étude montre que le glucagon s'avère important lors de l'exercice pour l'augmentation de la PHG même si une augmentation de la glucagonémie, mesurée en périphérie, n'est pas toujours significative.

En 1998, Drouin et collaborateurs (16) publiaient une étude indiquant que l'entraînement en endurance induit une hausse de la production hépatique de glucose suite à une stimulation au glucagon chez l'humain. Lors de cette étude, les sujets sédentaires et entraînés en endurance, ont été traités à la somatostatine de manière à inhiber les sécrétions endogènes d'insuline et de glucagon. L'infusion d'une concentration physiologique d'insuline et de glucagon dans les groupes sédentaire et entraîné a résulté en une augmentation de la PHG de 53 % chez les sujets entraînés ($7,4 \pm 1,6$ vs. $15,8 \pm 2,8 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivement). Depuis, l'augmentation de la PHG induit par l'entraînement en endurance en réponse au glucagon a aussi été démontré chez l'animal (17). Suite à ces résultats, les auteurs de ces études suggèrent que la modulation de l'activité des récepteurs hépatiques au glucagon pourrait en partie expliquer les

résultats obtenus. En effet, Légaré et col. (45) ont confirmé, chez le rat, une hausse de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon de l'ordre de 28 % suite à huit semaines d'entraînement en endurance.

Plus récemment, soit en 2002, le groupe de Bonjorn et collaborateurs (9) ont vérifié l'influence de l'exercice sur la sensibilité du foie au glucagon. Cependant, contrairement aux études de Drouin et col. (16) et Légaré et col. (45) qui ont étudié l'effet de l'exercice chronique i.e. l'entraînement en endurance, Bonjorn et col. (9) ont observé l'effet d'une seule période d'exercice sur la réponse de la sensibilité hépatique au glucagon chez le rat. Pour ce faire, les rats ont été soumis, dans un premier temps, à une période d'exercice de 60 minutes. Suite à cette période d'exercice, la production hépatique de glucose fut mesurée pendant 60 minutes durant laquelle les animaux recevaient du glucagon. Les résultats de cette étude montrent une augmentation rapide de la production hépatique de glucose en réponse à une même concentration de glucagon chez les animaux ayant fait de l'exercice comparativement à des animaux au repos. À cette étape, les mécanismes responsables de l'augmentation de la réponse du glucagon à l'exercice aigu sont encore mal connus.

1.3 Le récepteur au glucagon

Toute action physiologique impliquant le glucagon implique une liaison à son récepteur. La distribution du récepteur au glucagon a été étudiée chez le rat (18, 26). L'expression du récepteur se fait majoritairement au niveau du foie et dans un second temps au niveau des reins. On retrouve également des récepteurs au niveau du cœur, des tissus adipeux, de la rate, du thymus, du pancréas, du cortex cérébral et du tractus intestinal (73) (figure 1.6).

Le récepteur au glucagon chez l'homme est situé sur le chromosome 17q25 (48). Chez le rat et la souris, le récepteur au glucagon est composé de 485 acides aminés (figure 1.6) comparativement à 477 chez l'humain (69). Appartenant à la superfamille

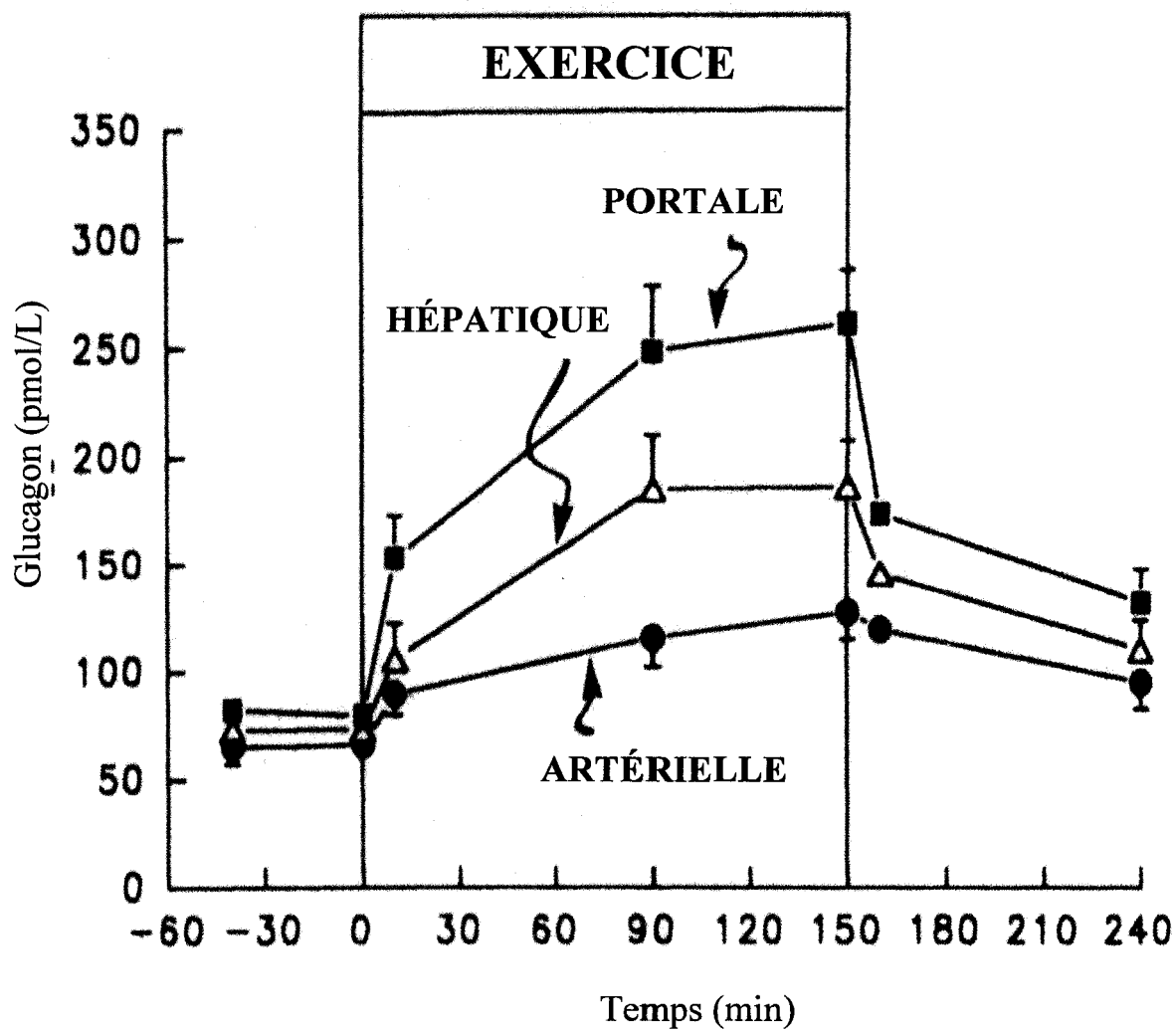


FIGURE 1.5 : Variation chez le chien de la glucagonémie à l'exercice selon 3 différents sites de prélèvement. Adaptée de : Wasserman et col., 1993.

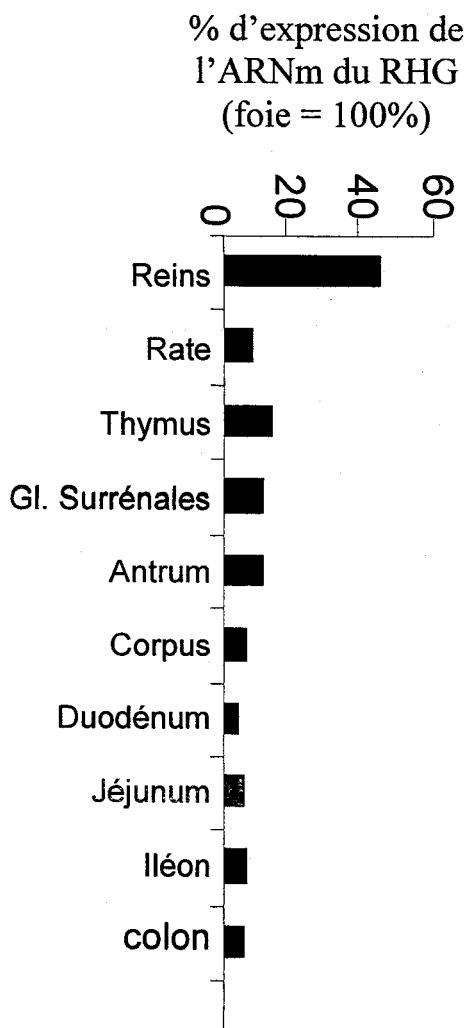
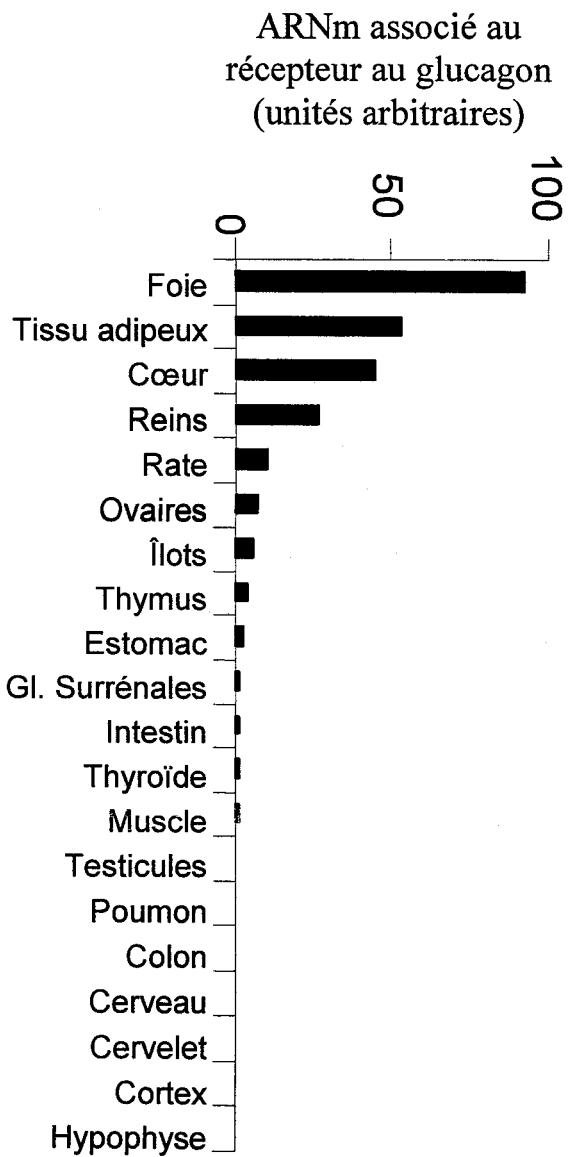


FIGURE 1.6 : Distribution et expression de l'ARNm associé au récepteur au glucagon chez le rat. Adaptée de : Dunphy et col. 1998, Hansen et col. 1995.

des récepteurs liés aux protéines G, le récepteur au glucagon est une glycoprotéine de 62 kDa et est principalement composé de 7 domaines transmembranaires, d'une chaîne N-terminale extracellulaire servant à la liaison du glucagon et d'une longue chaîne carboxy-terminale intracellulaire faisant le lien avec le complexe protéine G (33, 50). Il existe plus de 1000 différents récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs liés aux protéines G divisés selon leur similarité structurale en trois catégories (A, B et C). Le récepteur au glucagon fait partie de la sous-classe B qui est caractérisée par la présence de ponts disulfures reliant les boucles du domaine N-terminal (52).

Jusqu'au début des années 90, la littérature faisait mention de deux types de récepteurs au glucagon, soient RG1 et RG2 (64, 78). La distinction de ces deux types de récepteurs reposait sur la nature du second messager utilisé dans l'action du glucagon. Le RG1 était associé via la protéine G à l'activation de la phospholipase C responsable de la concentration du calcium/phosphatidylinositol alors que le RG2 était associé à l'activation de l'adénylate cyclase variant ainsi la concentration d'AMPc. Cependant, il a été montré depuis, autant chez l'homme (51) que chez le rat (37) qu'il existe bel et bien un seul et unique type de récepteur au glucagon ayant la capacité de stimuler les deux voies de seconds messagers (figure 1.8). Même si les mécanismes responsables de cette double activation demeurent à être caractérisés, il a été démontré que les récepteurs au glucagon possèdent la capacité de se lier à différentes protéines G, ce qui confirme l'activation des deux voies de signalisation différentes (52).

1.3.1 Caractérisation du récepteur

La première étape à effectuer lors de l'étude de la régulation d'un récepteur est une épreuve de radioliation (22) afin d'obtenir la densité (B_{max}) et l'affinité (K_d) du récepteur au glucagon. Le principe de cette méthode est de mesurer, à l'équilibre, les concentrations de ligand radioactif liées et non-liées aux récepteurs en utilisant des concentrations croissantes de glucagon marqué à l'iode-¹²⁵ afin d'obtenir une saturation des récepteurs. La représentation graphique de la courbe de saturation (figure 1.9) permet de déterminer le nombre de sites de liaison (B_{max}) ainsi que l'affinité (K_d) du

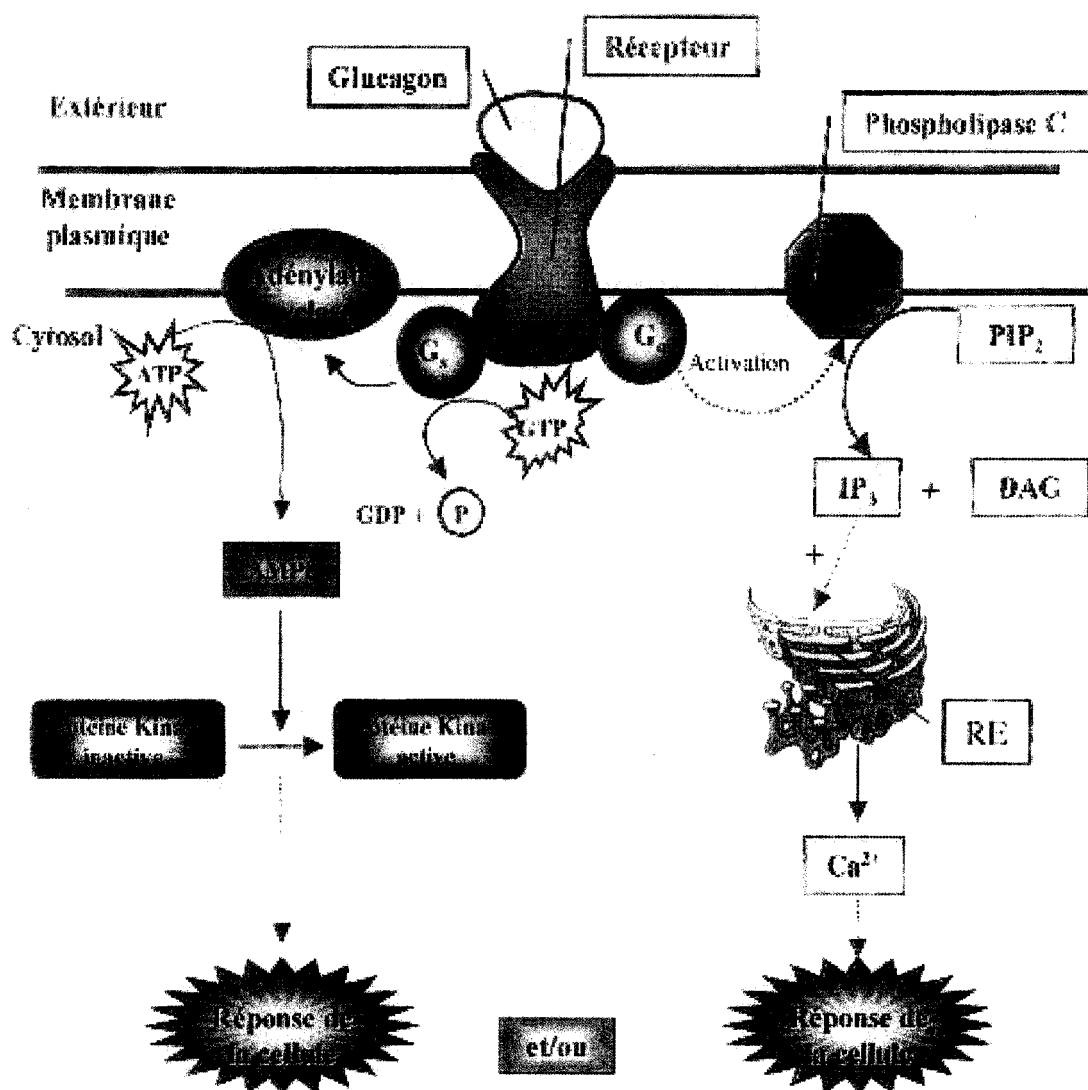


FIGURE 1.8 : Activation intracellulaire du récepteur au glucagon. Adaptée de: Lodish et col. 1997.

récepteur au glucagon. Le plateau de la courbe correspond à la quantité maximale de glucagon marqué lié et nous indique également le nombre de récepteurs. L'affinité du récepteur pour le glucagon est déterminée par sa constante de dissociation (K_d) qui est représentée par l'équation :

$$K_d = \frac{R \cdot L}{RL}$$

dans laquelle R et L représentent les concentrations respectives du récepteur libre et du glucagon non-lié et RL la concentration du complexe récepteur-ligand. À partir de la courbe de saturation, il est possible de déterminer le K_d qui correspond à la moitié de la concentration de glucagon nécessaire à la liaison de la moitié des récepteurs. À ce point précis, R possède la même valeur que RL alors :

$$K_d = \frac{R \cdot L}{RL} \quad \longrightarrow \quad K_d = L$$

Puisque le K_d correspond à une constante de dissociation, plus sa valeur sera élevée, plus l'affinité du récepteur pour le glucagon sera faible et vice versa.

1.3.2 Récepteur au glucagon et jeûne

À notre connaissance, peu de données sont disponibles sur les propriétés de liaison des récepteurs au glucagon en situation de jeûne. Parmi les études disponibles dans la littérature, l'une fait mention de malnutrition chronique et une autre mesure le niveau d'ARNm associé au récepteur au glucagon. Selon Rao et collaborateurs (65), les propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon ne sont pas affectées de façon significative par une situation de malnutrition chronique i.e. 60 % de la consommation normale pendant 8 semaines. Cependant, selon Burcelin et col. (12), 48 heures de jeûne complet entraîne une augmentation de plus de 400 % de l'ARNm codant pour le récepteur hépatique au glucagon. Considérant que le récepteur est un des principaux médiateurs de la néoglucogénèse lors d'un jeûne, il s'avère important de vérifier si l'augmentation de l'ARNm associé au récepteur hépatique au glucagon

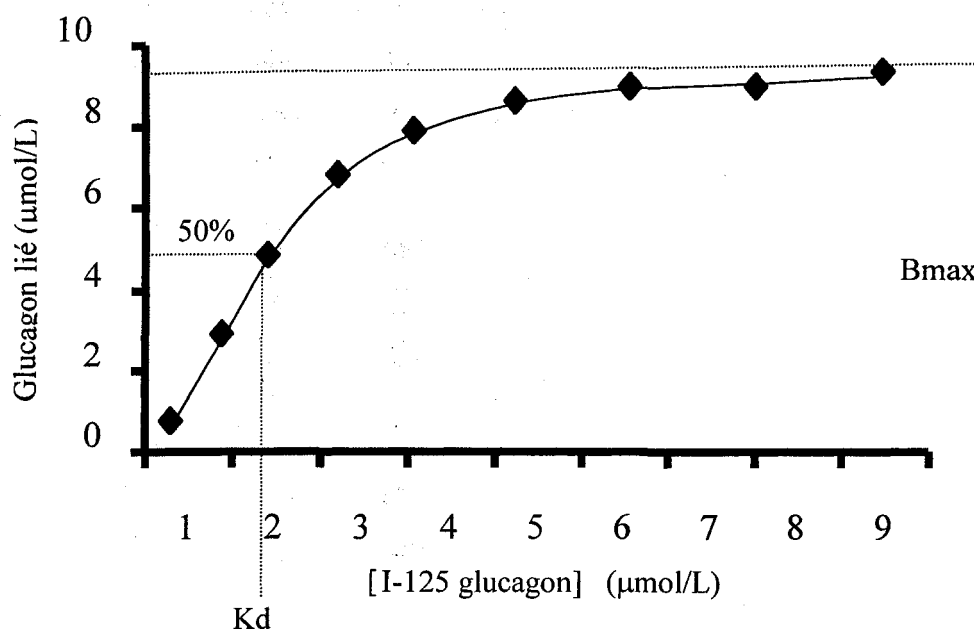


FIGURE 1.9 : Exemple type d'une courbe de saturation.

rapporté par Burcelin et col. se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire des hépatocytes suite à une période de jeûne.

1.3.3 Récepteur au glucagon et l'exercice

Suite à une période d'entraînement en endurance, l'activité de l'AMPc associée au récepteur hépatique au glucagon augmente de façon considérable (58). Cette hausse d'activité enzymatique reliée au récepteur hépatique au glucagon pourrait être associée à l'augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon observée par Drouin et col. (16, 17). En 2000, Légaré et collaborateurs ont vérifié l'implication du récepteur dans les phénomènes mentionnés ci-dessus en mesurant les propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon chez des rats sédentaires et chez des rats entraînés à la nage pendant 8 semaines à raison de 5 séances de 180 minutes par semaine (45). Aucune différence significative au niveau de l'affinité des récepteurs n'a été observée ($K_d = 0,57$

$\pm 0,06$ vs. $0,77 \pm 0,09$ nmol/L pour les groupes sédentaires et entraînés, respectivement). Cependant, la densité des récepteurs observée 48 heures après la dernière séance d'entraînement chez les rats entraînés était significativement supérieure à celle observée chez les rats sédentaires ($B_{\max} = 4,28 \pm 0,19$ vs. $3,09 \pm 0,12$ pmol/mg de protéines, respectivement). Ces résultats indiquent que l'augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon suite à l'entraînement en endurance est en partie due à une augmentation de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon. Bien que l'augmentation de la densité des récepteurs au glucagon a été identifiée comme étant un des facteurs responsables de la hausse de la sensibilité hépatique au glucagon suite à un entraînement en endurance (45), aucune donnée nous permet d'affirmer que ces mêmes changements puissent se réaliser à l'intérieur d'une seule période d'exercice de 180 minutes.

1.4 Problématique

En période de jeûne, la néoglucogenèse revêt une importance cruciale dans le maintien d'une normoglycémie. Puisque le glucagon est un médiateur de premier ordre dans la stimulation de la néoglucogenèse, l'implication de son récepteur dans la hausse de l'activité du glucagon en situation de jeûne est non-négligeable. Les résultats obtenus par Légaré et col. confirment que la hausse de la sensibilité hépatique au glucagon observée par Drouin et col. (16, 17) chez des rats et des humains ayant subi un entraînement en endurance provient en partie d'une augmentation de la densité des récepteurs au glucagon. Cependant, aucune donnée n'est disponible pour expliquer la hausse de la sensibilité hépatique au glucagon observée par Bonjorn et col. (9) suite à une seule période d'exercice. Ainsi, l'objectif de ce projet de maîtrise est de mesurer les propriétés de liaison du récepteur au glucagon suite à un jeûne et une période d'exercice. Plus précisément, nous avons mesuré, chez des animaux sains, l'affinité (K_d) et la densité (B_{\max}) des récepteurs hépatiques au glucagon dans les membranes plasmiques purifiées 1) à la suite d'un jeûne de 24 heures, et 2) à la suite d'une seule période d'exercice de 180 minutes.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

2.1 Procédures expérimentales

2.1.1 Animaux

Le présent projet a été réalisé avec des rats ($n = 21$) mâles Sprague-Dawley (Charles River, St-Hyacinthe, Qc, Canada). Les animaux ont été aléatoirement assignés à des groupes contrôle ($n = 7$), jeûne ($n = 7$) ou exercice ($n = 7$). Les animaux ont été placés dans des cages individuelles dans une pièce dont la température était maintenue à 20 °C et 55 % d'humidité relative. Les animaux ont également été soumis à des cycles diurne : nocturne 12 :12, et avaient libre accès à l'eau et à la nourriture à l'exception du groupe jeûne qui avait seulement accès à l'eau. Toutes procédures concernant les animaux respectaient les normes du Conseil canadien de protection des animaux et ont été approuvées par le Comité de bons soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

2.1.2 Jeûne

Les animaux assignés au groupe jeûne ont été privés de nourriture pour une période de 24 heures débutant à 8 :00 am le matin précédant le jour du sacrifice. Cependant, tout au long de la période de jeûne, les animaux ont eu libre accès à l'eau.

2.1.3 Exercice

Dix jours précédant la séance d'exercice, un cathéter a été installé dans la veine jugulaire droite des animaux assignés au groupe exercice (84). Quatre jours suivant la pose du cathéter, les animaux ont été soumis à trois sessions de nage de 15, 20 et 30 minutes sur trois journées consécutives. Cette procédure d'habituation réduit le stress pouvant être associé à la nage. Le jour de l'expérimentation, les rats ont été placés dans

des bassins de 60 x 90 cm contenant 50 cm d'eau à 37 °C. La période de nage de 180 minutes débutait entre 4 :30 et 5 :30 am et se terminait entre 7 :30 et 8 :30 am.

2.1.4 Sacrifice et échantillonnage des tissus

Les animaux ont été anesthésiés (pentobarbital sodique 50 mg/kg ip ou iv) entre 7 :30 et 8 :30 am suite aux conditions propres à chaque groupe d'animaux mentionnés ci-dessus. Après laparotomie, le sang a été prélevé via la veine cave abdominale utilisant des tubes EDTA. Après centrifugation du sang à 3 000 g pour 10 minutes, le plasma a été récupéré et conservé à -80 °C jusqu'au moment des analyses. Une section du lobe latéral droit du foie a également été prélevé et conservé dans une solution de sucrose à 4°C. Les autres lobes ont été placés dans l'azote liquide pour congélation immédiate et entreposés à -80°C jusqu'aux analyses. Finalement, les animaux ont été euthanasiés par sectionnement de l'aorte.

2.1.5 Isolation des membranes plasmiques des hépatocytes

L'isolation des membranes plasmiques des hépatocytes a été préparée selon la procédure décrite par Légaré (45). Suite à son excision, le foie a été immédiatement placé dans une solution de sucrose 0,25 mol/L, 5 mmol/L Tris-HCl à pH 8,0. Après avoir été coupés en petit morceaux, 2 grammes de foie ont été transférés dans un homogénéisateur Dounce contenant un système d'homogénéisation en deux phases aqueuses. Ce système contient une concentration finale de 5,7 % (p/p) de Dextran T-500 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 5,7 % (p/p) de polyéthylène glycol 3350 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), 0,15 mmol/L de Tris-H₂SO₄ à pH 7,8 et 2 grammes de foie pour un total de 15 grammes. Suite à l'homogénéisation, le système a été centrifugé à 150 g pendant 8 minutes. La phase du haut a été retirée et une nouvelle phase du haut a été ajoutée à la phase du bas restante et le nouveau système a été mélangé et centrifugé à son tour à 150 g pendant 8 minutes. La combinaison des deux phases du haut a été ajoutée à la phase du bas d'un système de partition en deux phases aqueuses ayant une

concentration finale de 6 % (p/p) de Dextran T-500, 6 % (p/p) de polyéthylène glycol 3350 et 20 mmol/L de Tris- H_3BO_3 à pH 8,0. La phase du bas de ce système contient également 50 mg de dextran lié à de l'agglutinine de germe de blé (Sigma-Aldrich). Après homogénéisation, les phases ont été séparées par centrifugation à 150 g pendant 8 minutes. La phase du haut a été retirée et la phase du bas a été mélangée avec une nouvelle phase du haut et centrifugée de nouveau à 150 g pendant 8 minutes. Suite à cette centrifugation, la phase du haut a été retirée pour ne garder que la phase du bas qui a été diluée 10 fois (v/v) avec une solution 0,25 M sucrose, 0,1 mol/L de N-acétylglucosamine (Sigma-Aldrich) et 5 mmol/L Tris-HCl à pH 8,0. Cette phase du bas diluée a ensuite été ultracentrifugée à 100 000 g pendant 60 minutes afin d'obtenir un culot contenant les membranes plasmiques purifiées qui ont été resuspendues dans du tampon HEPES 50 mmol/L à pH 7,6. La totalité des procédures a été réalisée à 4 °C. Le pourcentage de récupération des membranes lorsque mesuré par l'enzyme 5'nucléotidase, qui est un marqueur membranaire, est de $63,5 \pm 7,0$ %. La concentration de protéines contenues dans le culot a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratory, Mississauga, ON)

2.1.6 Radioliation

La technique utilisée dans notre laboratoire pour l'épreuve de radioliation des membranes plasmiques est celle de Légaré et col. (45) adapté de Frandsen et col. (22). L'iodation du glucagon a été réalisé commercialement à l'aide d'une technique de lactoperoxidase et purifié par chromatographie liquide de haute performance (I^{125} glucagon, NEN Life Science Products, Boston, MA). Les membranes plasmiques (10 μg de protéines/150 μl) ont été incubées en présence de glucagon marqué à l'iode - 125 à des concentrations allant de 0,15 à 3,00 nmol/L et d'une solution de tampon HEPES 50 mM à pH 7,6 contenant 1 % d'albumine sérique humaine (Sigma-Aldrich) pour un volume total de 150 μl . La période d'incubation a été de 30 minutes à 30 °C. Suite à la période d'incubation, 100 μl de la solution ont été retirés pour être ajoutés à

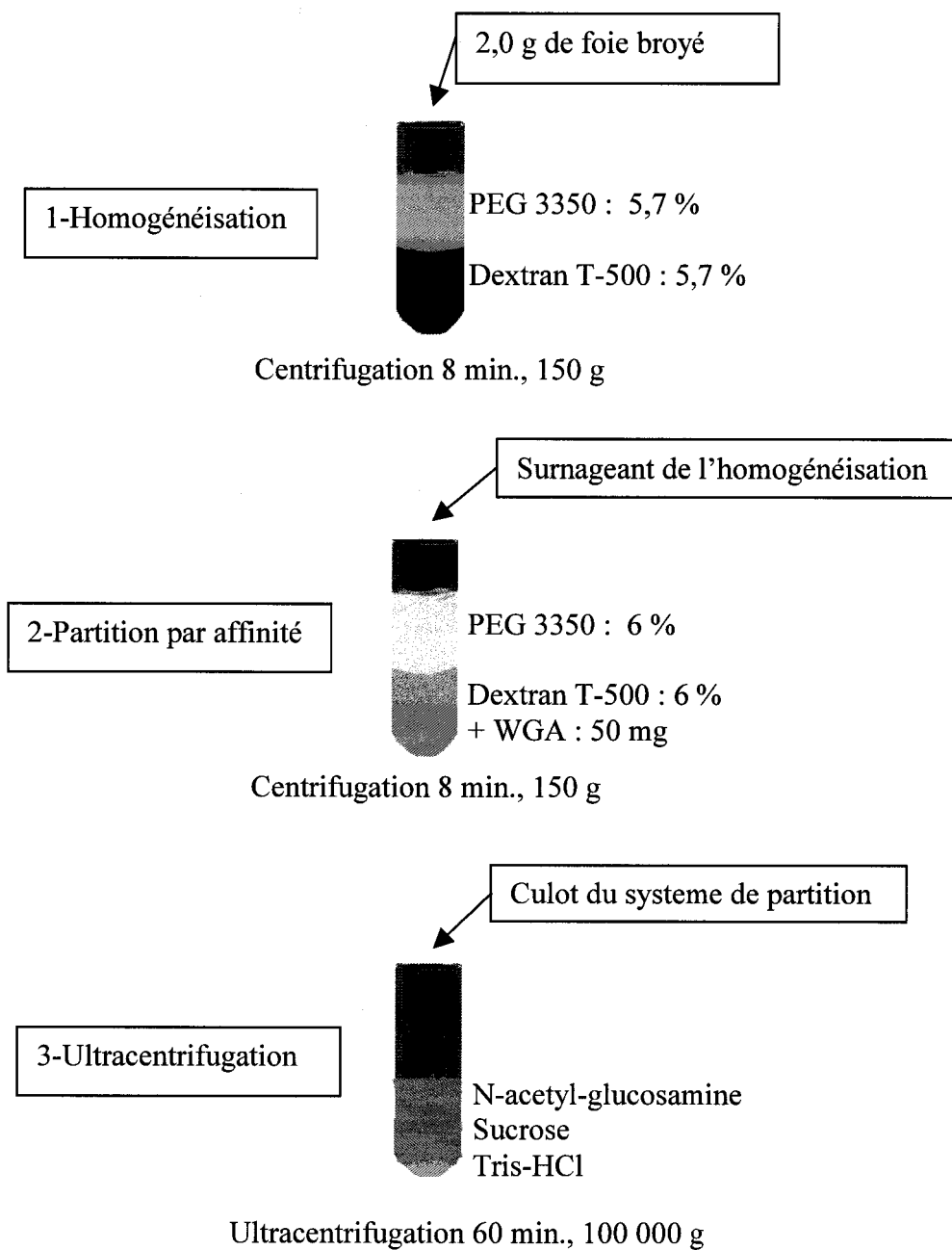


FIGURE 2.1 Représentation schématique de la préparation de membranes plasmiques des hépatocytes.

200 µl d'une solution de tampon HEPES pH 7,6 contenant 2,5 % d'albumine sérique humaine à 4 °C. Les membranes plasmiques liées et non-liées ont été séparées par centrifugation à 10 000g pendant 5 minutes pour ne garder que le culot contenant les membranes plasmiques liées au I¹²⁵-glucagon. Le culot a été lavé avec une solution de tampon HEPES pH 7,6 contenant 2,5 % d'albumine sérique humaine et la radioactivité reliée à la liaison du I¹²⁵-glucagon aux membranes plasmiques a été déterminée par un compteur gamma (Wallac 1470 Wizard, Wellesley, MA). La présence de liaison non-spécifique a été mesurée suite à une incubation des membranes dans une solution contenant du glucagon non marqué en excès (3 µmol/L) et des concentrations de I¹²⁵-glucagon (0,15- 3,00 nmol/L) correspondant à chacun des points utilisés pour obtenir la courbe de saturation. L'analyse de la courbe de saturation a été exécutée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) nous permettant d'obtenir la densité (Bmax) et l'affinité (Kd) des récepteurs au glucagon.

2.2 Analyses

2.2.1 Glycogène

Des morceaux de foie ont d'abord été lyophilisés et réduits en poudre. Le contenu en glycogène des échantillons a été déterminé par une méthode d'hydrolyse à l'acide décrite par Passoneau et Lauderdale (62). Une quantité pré-déterminée de foie en poudre (\pm 10 mg) a été mélangée avec 200 µl d'acide perchlorique 1,5 mol/L (Fisher Scientific, Nepean, ON). Le tout a été placé sur glace pour une période de 20 minutes. Pour chaque échantillon, 2 ml d'acide chlorhydrique 1 mol/L (Fisher Scientific) a été ajouté et 40 µl ont été prélevés et neutralisés avec 30 µl de TRIZMA base 2 mol/L (Sigma-Aldrich) pour déterminer le glucose pré-hydrolyse. Les portions non neutralisées ont été placées dans un bain d'eau à 100 °C pour 2 heures pour être par la suite neutralisées avec 1.5 ml de TRIZMA base 2 mol/L et centrifugées à 3 000 g pendant 5 minutes. La concentration de glucose a été mesurée dans le surnageant afin de déterminer la valeur post-hydrolyse. La valeur de glycogène pour chaque échantillon a été obtenue en soustrayant la valeur pré-hydrolyse de la valeur post-hydrolyse.

2.2.2 Glucose

La concentration de glucose plasmatique a été déterminée par spectrophotométrie utilisant le réactif Infinity™ (Sigma-Aldrich). Dans cette technique, l'hexokinase catalyse la phosphorylation du glucose par l'adénosine triphosphate (ATP), formant ainsi du glucose-6-phosphate et de l'ADP. Le glucose-6-phosphate est alors oxydé en 6-phosphogluconate en présence d'adénine nicotinamide dinucléotide (NAD) sous l'action de la glucose-6-phosphate deshydrogénase. Au cours de cette réaction, le NAD est réduit en NADH. L'augmentation de la quantité de NADH peut être mesurée par densité optique à une longueur d'onde de 340 nm et est directement proportionnelle à la concentration de glucose présente dans les échantillons.

2.2.3 Glucagon et insuline

Les concentrations plasmatiques de glucagon (Inter Medico, Markham, ON) (59) et d'insuline (Medicorp, Montréal, QC) (53, 57) ont été déterminées par des méthodes radio-immunologiques utilisant des essais disponibles commercialement. Le principe de ces tests implique la liaison compétitive d'un antigène radiomarqué (I^{-125}) et d'un antigène non marqué à des anticorps de haute affinité fixé à chacun des tubes.

2.3 Statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne et erreur standard de la moyenne (\pm SEM). L'évaluation des données a été réalisée par une analyse de la variance à une dimension (Anova) pour comparer tous les paramètres mesurés dans cette étude. Quand ces analyses ont révélé des différences significatives, un test post hoc Newman Keuls a été utilisé pour la comparaison avec le groupe contrôle. Un seuil significatif de $P < 0,05$ a été retenu.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Données descriptives

Le poids des animaux au moment du sacrifice chez les groupes contrôle, jeûne et exercice était similaire (tableau 3.1).

TABLEAU 3.1
Poids des animaux le matin du sacrifice (8 :00 am).

	Contrôle	Jeûne	Exercice
Poids (grammes)	433 ± 9	432 ± 4	421 ± 9

Cependant dans les 24 heures précédant le sacrifice, le groupe contrôle a subi une légère augmentation de poids alors qu'une baisse significative a été noté chez le groupe jeûne. L'absence d'analyse au niveau de la variation de poids des animaux exercice est attribuable au court délai désiré entre le moment de l'injection de l'anesthésiant et le prélèvement du foie.

En plus du poids corporel, le poids du foie chute suite à un jeûne de 24 heures. Les animaux ont également vu leur ratio masse hépatique/masse corporelle diminuer de façon significative et ce, même en considérant la perte de masse corporelle subie par les animaux suite au jeûne.

TABLEAU 3.2**Variation du poids des animaux 24 heures précédant le sacrifice.**

	Variation du poids 24 heures avant le sacrifice (grammes) (%)	
Contrôle	+3,2 ± 0,4	+ 0,74
Jeûne	-28,8 ± 2,3*	- 6,67*
Exercice	n.d.	n.d.

* $P < 0,05$ vs groupe contrôle**TABLEAU 3.3****Ratio masse hépatique/masse corporelle suite à 24 heures de jeûne.**

	Ratio masse hépatique/masse corporelle (%)
Contrôle	3,60 ± 0,13
Jeûne	2,80 ± 0,05

3.2 Métabolites et substrats glucidiques

Aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la concentration plasmatique de glucose entre les trois groupes d'animaux et ce en dépit d'une déplétion importante des réserves de glycogène hépatique (fig 3.1). Au niveau de la concentration

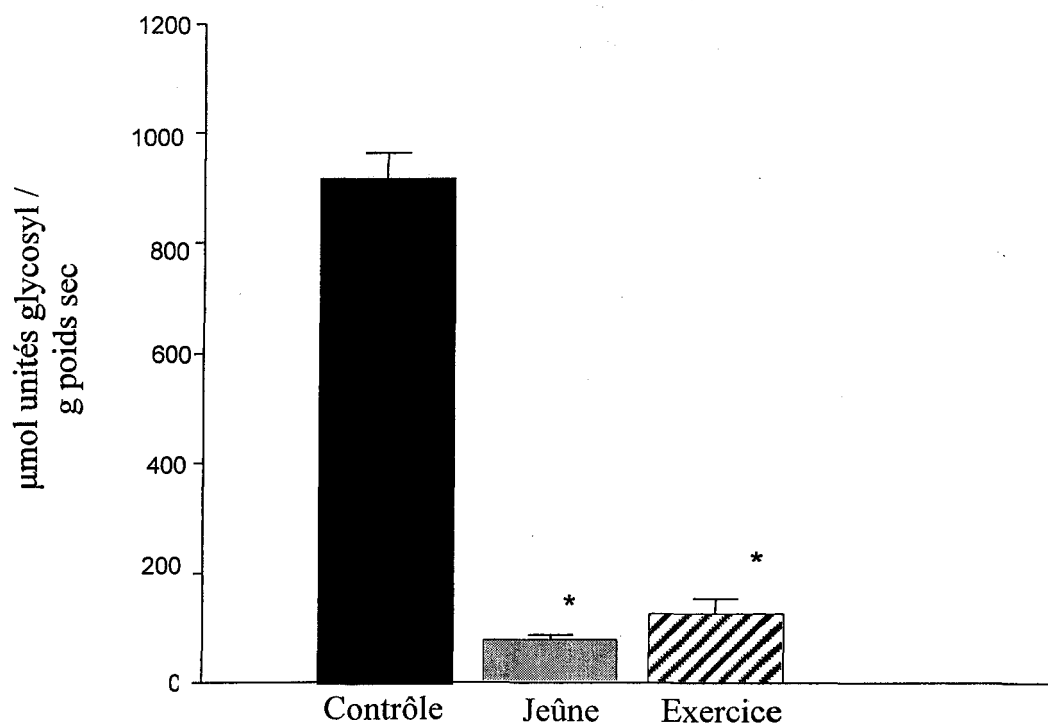
plasmatique de β -hydroxybutyrate, le jeûne et l'exercice ont entraîné des augmentations de 350 et 420 % respectivement lorsque comparée aux valeurs du groupe contrôle.

TABLEAU 3.4
Concentrations plasmatiques de glucose, β -hydroxybutyrate et lactate.

	Contrôle	Jeûne	Exercice
Glucose plasmatique (mmol/L)	$7,4 \pm 0,8$	$7,7 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,5$
β -hydroxybutyrate (mmol/L)	$0,15 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,08^*$	$0,63 \pm 0,06^*$
Lactate (mmol/L)	$2,17 \pm 0,21$	$1,67 \pm 0,23$	$3,68 \pm 0,51^*$

* $P < 0,05$ vs groupe contrôle

Une période de jeûne de 24 heures ou d'exercice de 180 minutes a induit une diminution de la concentration en glycogène hépatique passant de 921 ± 48 μmol unités glycosyl /g poids sec chez le groupe contrôle à 76 ± 9 et 128 ± 28 μmol unités glycosyl /g poids sec chez les groupes jeûne et exercice respectivement. En terme de pourcentage, la déplétion des réserves de glycogène hépatique (figure 3.1) est de l'ordre de 86 et 92 % chez les rats à jeuns et à exercices respectivement.



* $P < 0,05$ vs groupe contrôle

FIGURE 3.1 Concentration totale de glycogène hépatique des groupes contrôle, jeûne et exercice.

3.3 Hormones

Les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucagon sont illustrées à la figure 3.2. La concentration plasmatique d'insuline a diminué de $326,9 \pm 13,0$ pmol/L chez les rats contrôle à $178,9 \pm 35,3$ et $174,2 \pm 13,8$ pmol/L chez les rats à jeuns et exercices ce qui correspond à une diminution de 45 % et 47 % respectivement. Au niveau de la concentration plasmatique de glucagon, seul le groupe exercice a subi une augmentation significative passant de $33,5 \pm 2,7$ à $59,9 \pm 11,8$ suite à 180 minutes d'exercice. Lorsque exprimé en ratio glucagon/insuline, ce dernier a augmenté de façon significative chez les groupes expérimentaux jeûne et exercice ($0,19 \pm 0,06$ vs $0,34 \pm$

0,12) lorsque comparé aux valeurs des animaux contrôles ($0,10 \pm 0,02$). Une augmentation de 91 % du ratio a été observé chez les rats à jeun comparativement à une augmentation de 236 % chez les rats à l'exercice.

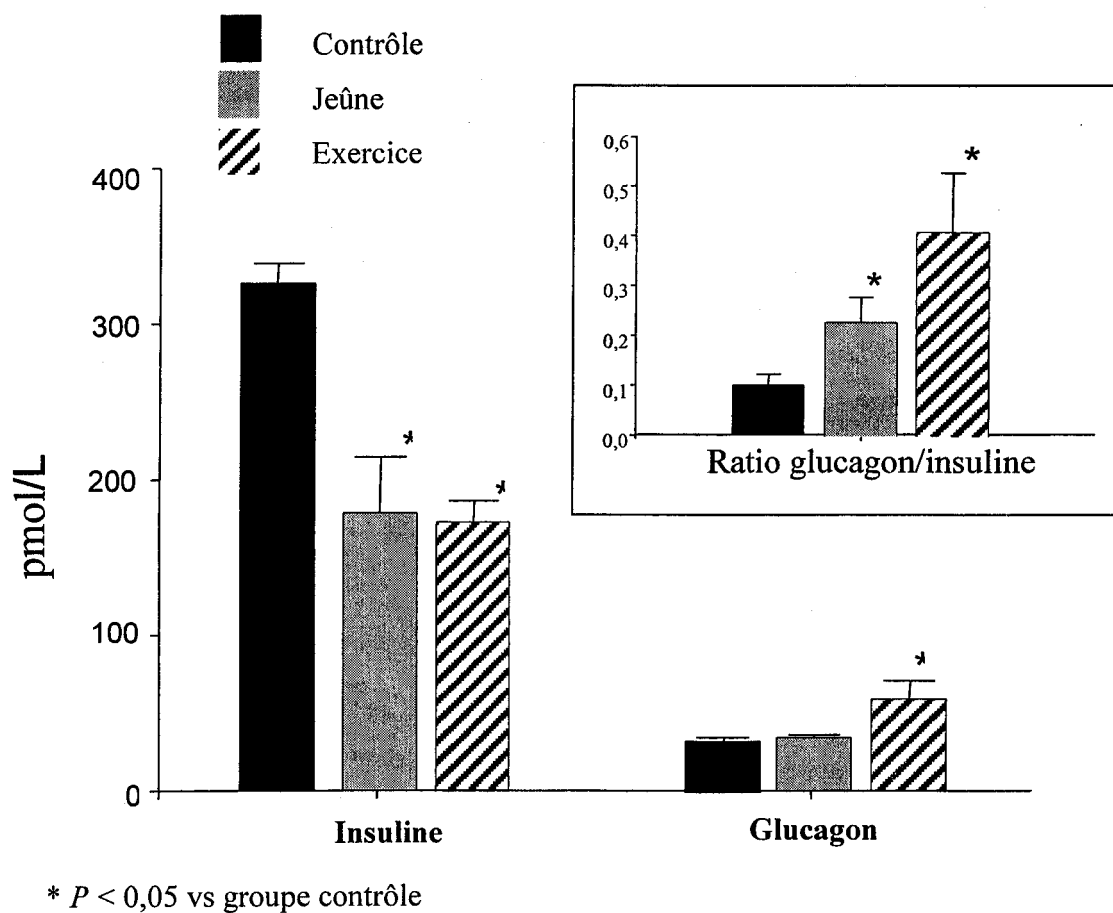


FIGURE 3.2 Concentrations plasmatiques d'insuline de glucagon et ratio glucagon/insuline des groupes contrôle, jeûne et exercice.

3.4 propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon

La liaison spécifique des récepteurs hépatiques au glucagon a été saturé avec des concentrations de glucagon entre 1,0 et 3,0 nmol/L chez les trois groupes d'animaux

observés. L'analyse des différentes courbes de saturation a montré chez les trois groupes la présence d'un seul type de récepteur au glucagon caractérisé par la présence d'un seul plateau pour chacune des courbes de saturation. La densité des récepteurs, qui est représentée par la valeur du plateau, est augmentée dans les deux groupes expérimentaux. La valeur du plateau du groupe contrôle est de 0,206 nmol/l alors que les plateaux des groupes jeûne et exercice sont de 0,534 et 0,546 nmol/l respectivement (figure 3.3a). La représentation Scatchard (fig 3.3b) représente la dérivée des courbes de saturation. Lors d'une représentation Scatchard, le B_{max} correspond à l'ordonnée à l'origine de chacune des droites alors que le K_d correspond à l'inverse négatif de la pente ($K_d = -1/\text{pente}$).

La densité des récepteurs hépatiques au glucagon est significativement supérieur chez les animaux des groupes jeûne et exercice. De façon quantitative (tableau 3.3), la densité (B_{max}) des récepteurs hépatiques au glucagon a augmenté de 159 et 165 % suite à un jeûne de 24 heures et à 180 minutes d'exercice respectivement. Au niveau de l'affinité des récepteurs, aucun changement significatif n'a été observé suivant l'exercice. Cependant, chez le groupe jeûne, une augmentation du K_d se traduisant par une diminution de l'affinité de 41 % a été observée.

En conclusion une période de jeûne de 24 heures induit chez le rat une diminution significative du poids, des réserves de glycogène hépatique, de la concentration plasmatique d'insuline et de l'affinité du glucagon pour son récepteur hépatique. En contre partie, une augmentation significative a été observée au niveau de la concentration plasmatique de β -hydroxybutyrate, du ratio glucagon/insuline et de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon. Suite à une période d'exercice de 180 minutes, la concentration plasmatique de β -hydroxybutyrate, de lactate et de glucagon ainsi que la densité des récepteurs hépatiques au glucagon a augmenté alors que la concentration plasmatique d'insuline a chuté. Finalement il est important de noter que le jeûne et l'exercice n'ont apporté aucune variations significatives au niveau de la concentration plasmatique de glucose.

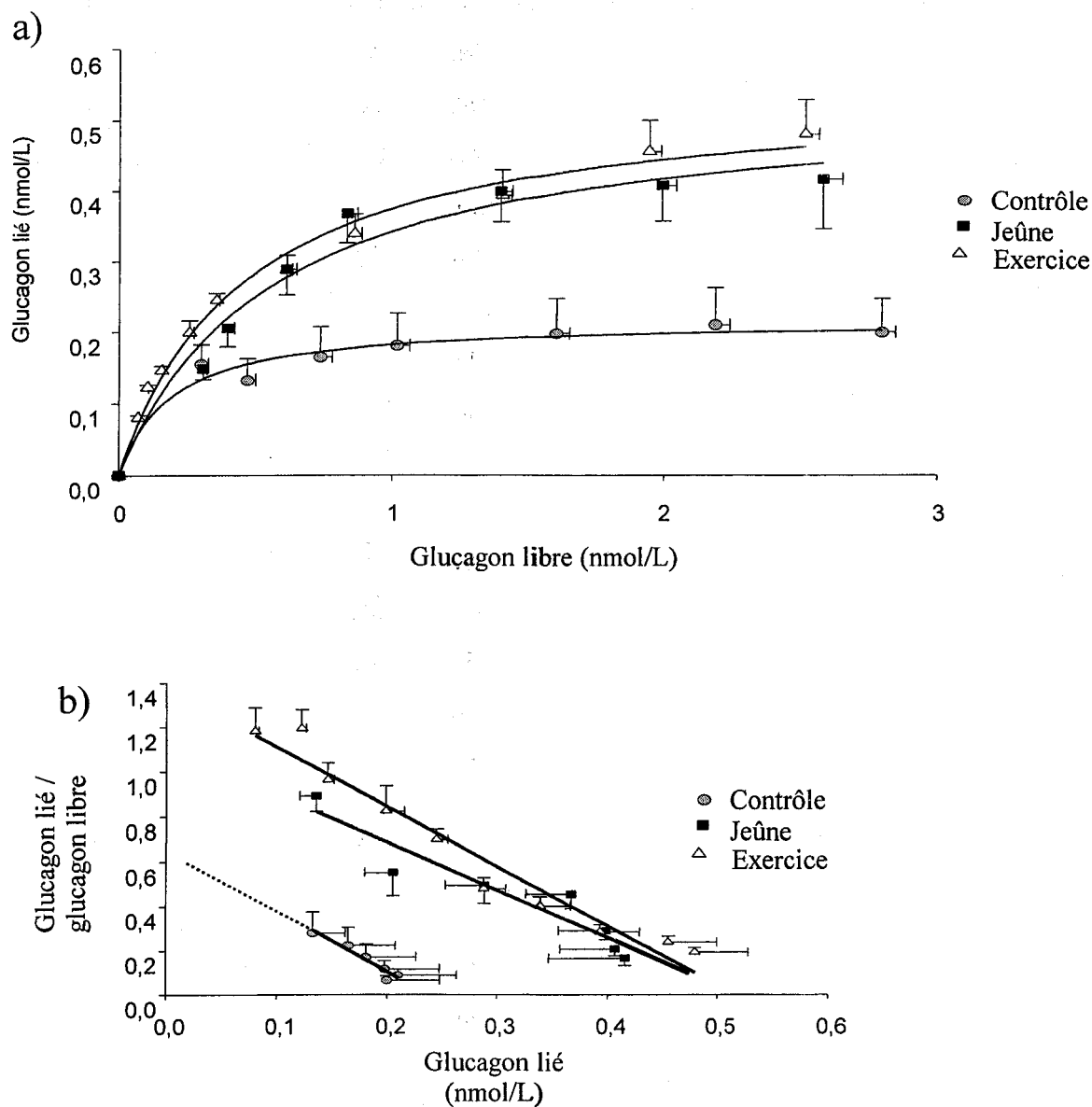


FIGURE 3.3 Propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon sous forme de courbes de saturations (a) et sous forme de représentation Scatchard (b) chez les groupes contrôle, jeûne et exercice.

TABLEAU 3.5
Propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon

	Bmax (pmol/mg de protéines)	Kd (nmol/L)
Contrôle	3,09 ± 0,12	0,33 ± 0,05
Jeûne	8,01 ± 0,65*	0,56 ± 0,13*
Exercice	8,19 ± 0,29*	0,46 ± 0,05

* $P < 0,05$ vs groupe contrôle

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'objectif de ce projet de maîtrise consistait à mesurer les propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon suite à 1) une période de jeûne de 24 heures, et 2) une période d'exercice de 180 minutes.

Le présent travail de maîtrise a été concrétisé par la préparation pour la publication des résultats des propriétés de liaison des récepteurs au glucagon et a nécessité dans un premier temps une compréhension des techniques utilisées. La signification des résultats obtenus lors de ce projet seront également approfondis dans cette section.

4.1 Techniques utilisées

Le protocole qui a mené à la réalisation de ce projet de maîtrise peut être divisé en quatre grandes parties soient : la préparation des animaux pour la canulation de la veine cave inférieure, la purification de membranes plasmiques de foie de rats, la radioliation des récepteurs hépatiques au glucagon et le dosage des différentes hormones et substrats.

La canulation veineuse des animaux consiste en l'insertion d'un cathéter dans la veine jugulaire de l'animal. Élaborée par Waynforth et col. (84), cette technique permet de réduire considérablement le délai entre le moment de l'injection et de l'action de l'anesthésiant permettant ainsi un prélèvement plus rapide du foie et ce particulièrement lors des études à l'exercice. La réalisation de cette partie du protocole est d'une importance capitale chez les animaux à l'exercice afin d'observer des paramètres physiologiques se rapprochant le plus possible de ce qui se passe à l'exercice et d'éviter par le fait même toute période de récupération pouvant modifier les résultats. La canulation veineuse a également été effectuée sur quelques animaux du groupe contrôle

(n=3). Aucun changement significatif n'a été observé au niveau des paramètres mesurés lors du présent projet entre les animaux canulés et non-canulés du groupe contrôle.

La technique de purification de membranes plasmiques de foie de rats consiste en un système de partition par affinité en deux phases aqueuses. La récupération de membranes plasmiques, en utilisant la technique adaptée dans notre laboratoire de biochimie de l'exercice par Légaré et col. (45), est de l'ordre de $63,5 \pm 7,0$ % lorsque mesurée par le dosage d'un marqueur enzymatique spécifique aux membranes plasmiques, dans le cas présent la 5'-nucléotidase. De plus, selon Persson et Jergil (63), les membranes plasmiques ne sont pas ou très peu contaminées par des membranes d'organites comme il est possible de voir dans le tableau 4.1.

TABLEAU 4.1
Distribution des marqueurs membranaires enzymatiques.

Marqueur	Organites ciblés	Solution de départ (%)	Culot final (%)
5'-nucléotidase	Mem. plasmiques	100	63,5
Arylesterase	Reticulum endoplasmique	100	< 2
Galactosyltransferase	Golgi	100	9,8
Succinate reductase	Mitochondries	100	< 2
N-acetyl-B-glucosamidase	Lysosomes	100	4,7

La radioliation des récepteurs hépatiques au glucagon est basée sur une technique décrite par Légaré et col. (45). L'iodation du glucagon a été réalisé selon une technique

de lactoperoxydase. Selon Rojas et col. (67), cette technique d'iodation du glucagon permet l'étude des propriétés structurales et fonctionnelles du récepteur au glucagon. Les études des propriétés de liaison des récepteurs au glucagon que l'on retrouve dans la littérature, ont été réalisées en utilisant le même type de glucagon- I^{125} (21 et 5).

Il est à noter que le glucagon est une hormone peptidique qui possède la caractéristique d'adhérer à certains polymères tel que le polypropylène. Cette liaison crée un artéfact qui est représenté dans le graphique ci-dessous (fig 4.1). Une quantité importante de glucagon demeure fixé au polypropylène lors des manipulations en absence d'albumine sérique humaine (human serum albumine). Cette perte de glucagon peut entraîner des résultats erronés dans l'évaluation des liaisons récepteurs-ligands, particulièrement lorsque de faibles concentrations de glucagon ($< 0,6 \mu\text{mol/L}$) sont utilisées car le pourcentage de perte est beaucoup plus important. De manière à réduire les imprécisions causées par l'adhérence du glucagon au polypropylène lors de nos manipulations, il a suffi de faire incuber le polypropylène en présence d'une solution d'albumine (HSA 2,5%) pendant 2-3 minutes pour saturer les sites non-spécifiques de liaisons (79).

4.2 Effet du jeûne

Les résultats de la présente étude montrent qu'une période de 24 heures de jeûne chez des animaux sains induit une perte de masse corporelle de l'ordre de 7 %, comparable à ce qui est retrouvé dans la littérature (86). Wright et col. ont observé une baisse de la masse corporelle de l'ordre de 9 % chez le rat suite à une période de jeûne de 36 heures.

Aucun changement significatif au niveau de la concentration de glucose plasmatique n'a été observé et ce, malgré le fait que les réserves de glycogène hépatique soient épuisées à 92 %. Nos données sont conformes avec celles retrouvées dans la littérature, montrant que 24 heures de jeûne chez le rat induit une diminution de 93 % (23, 40) tandis qu'un épisode de jeûne de 48 heures induit une réduction de 83 à 94 %

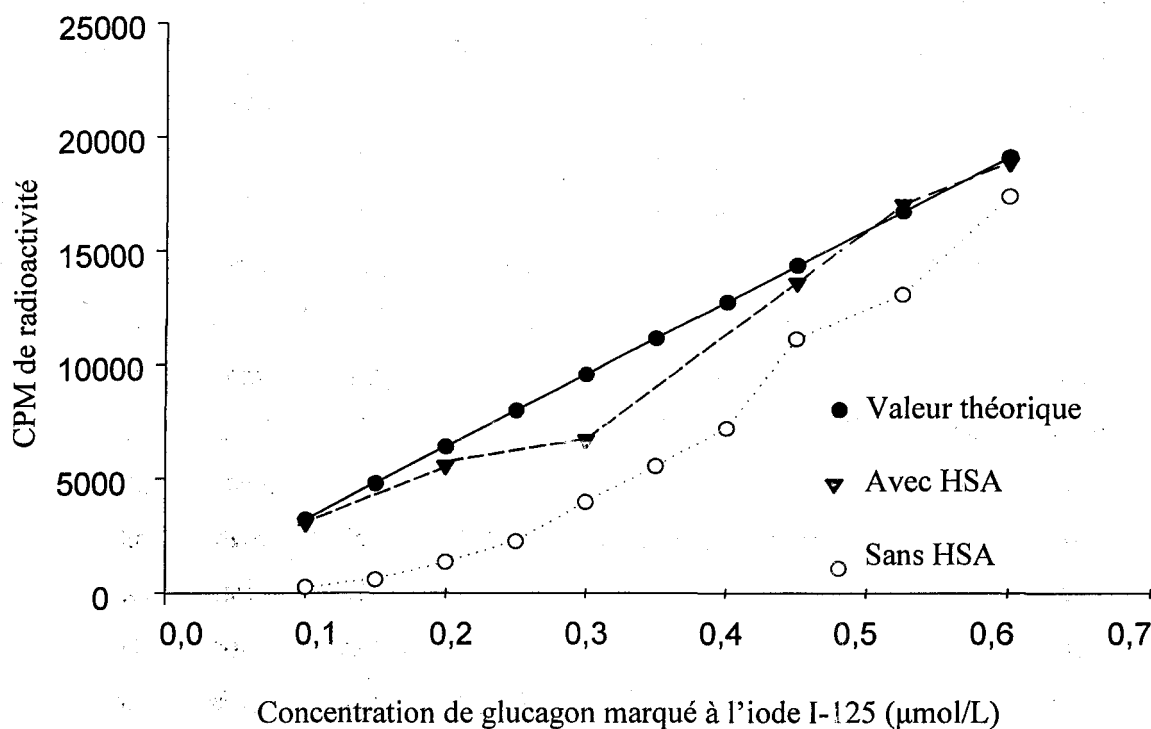


FIGURE 4.1 : Récupération du glucagon avec ou sans albumine.

(70) des réserves de glycogène hépatique. En période de jeûne, il semble que la PHG diminue en fonction de l'intensité et de la durée du jeûne. Selon Sonne et col. (70), la PHG diminue de 53 % chez des rats nourris à 50% de leur consommation quotidienne habituelle pour une période de 48 heures et diminue de 66 % chez des rats soumis à un jeûne complet depuis 48 heures. Cependant, les auteurs ont noté une diminution quasi complète des réserves hépatiques de glycogène et proposent que la baisse de la PHG observée provienne en grande partie d'une diminution de la glycogénolyse. Récemment, Drouin et col. (17) ont observé une diminution de la PHG de 60 % suite à une stimulation au glucagon chez des animaux à jeun 24 heures. La diminution de la glycogénolyse proposée par Sonne (70) suite à une période de jeûne doit nécessairement s'accompagner d'une augmentation de la néoglucogenèse de manière à répondre adéquatement aux exigences glucidiques de l'organisme. À ce stade, nos résultats ne

peuvent infirmer ou confirmer celles de Sonne et col. puisque dans la présente étude nous n'avons pas mesuré la contribution de la néoglucogenèse à la PHG. Avec des réserves de glycogène réduites, le maintien d'une normoglycémie chez les animaux repose sur la néoglucogenèse et en partie sur une augmentation importante du ratio glucagon/insuline. Celui-ci augmente de 91 % chez les animaux à jeun comparativement aux animaux contrôles. Pour leur part, Friman et col. (23) ont observé chez des rats une augmentation du ratio glucagon/insuline de 69 et 130 % suite à des périodes de jeûnes de 24 et 48 heures respectivement.

Au niveau des récepteurs, le plateau unique de la courbe de saturation (fig 3.3) indique la présence d'un seul type de récepteur de même affinité (34). Le niveau du plateau plus élevé de la courbe du groupe jeûne comparativement au groupe contrôle indique une densité des récepteurs plus importante chez les animaux à jeun. Cette augmentation est confirmée par la représentation Scatchard où l'ordonnée à l'origine, qui correspond à la densité des récepteurs, est également supérieure pour le groupe jeûne. Toujours selon la représentation Scatchard, la différence entre les pentes des droites des groupes jeûnes et contrôles indique une diminution de l'affinité des récepteurs chez les animaux à jeun de 40 %. Néanmoins, les propriétés de liaison des récepteurs au glucagon sont modifiées à la hausse en période de jeûne considérant la hausse de 159 % de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon comme étant un facteur déterminant du maintien de la glycémie chez les rats à jeun. Les résultats observés lors de la présente étude sont en accord avec la littérature puisque qu'une augmentation de l'activité du glucagon semble nécessaire à la stimulation de la néoglucogenèse (8).

4.3 Effet de l'exercice

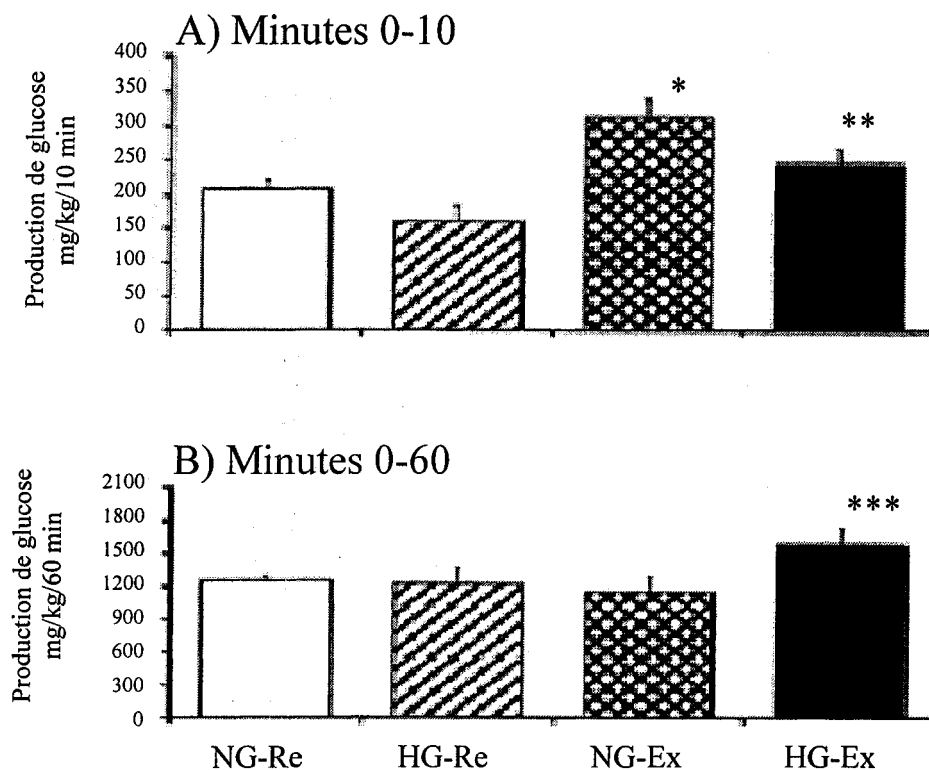
Suite à la période d'exercice de 180 minutes, aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la glycémie des rats ($7,4 \pm 0,8$ chez les animaux au repos et $8,1 \pm 0,5$ mmol/L chez les animaux à l'exercice). Ce maintien de la glycémie malgré une diminution de 86 % des réserves de glycogène hépatique est expliqué en partie par la contribution importante de la néoglucogenèse suite à l'augmentation de la concentration

plasmatique de glucagon de 78 % associée à une diminution de la concentration plasmatique de l'insuline de 47 %, résultant en une augmentation du ratio glucagon/insuline de 236 %. Cette hausse du ratio glucagon/insuline a également été démontré chez le rat par Friman et col. (23), qui ont, suite à un exercice de 120 minutes, observé une diminution significative de la quantité de glycogène hépatique ainsi qu'une augmentation du ratio glucagon/insuline de 136 % confirmant ainsi les résultats obtenus lors de la présente étude.

Au niveau des récepteurs, le plateau plus élevé de la courbe du groupe exercice comparativement au groupe contrôle indique une densité des récepteurs plus importante chez les animaux exercice. Le plateau unique de la courbe de saturation (fig 3.3) indique également la présence d'un seul type de récepteur de même affinité (34). L'augmentation de la densité des récepteurs est confirmé par la représentation Scatchard où l'ordonnée à l'origine, qui correspond à la densité des récepteurs, est supérieur pour le groupe exercice. Toujours selon la représentation Scatchard, la similarité entre les pentes des groupes contrôle et exercice indique qu'il n'y a pas de changement significatif entre l'affinité des récepteurs chez les animaux des deux groupes.

Récemment, Bonjorn et col. (9) ont observé une rapide augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon se traduisant par une hausse importante de la PHG suivant un exercice de 60 minutes et ce indépendamment du niveau des réserves de glycogène. Cependant, cette augmentation de sensibilité est supérieure dans les premières minutes de la période post-exercice et s'estompe après 60 minutes de stimulation au glucagon (fig 4.2).

Les résultats de l'étude de Bonjorn pourraient s'expliquer par une augmentation de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon à l'exercice confirmé par notre équipe, et pourrait nous guider sur les mécanismes responsables des changements des propriétés de liaisons des récepteurs hépatiques au glucagon.



* significativement différent du groupe NG-RE, ** significativement différent du groupe HG-RE, *** significativement différent du groupe NG-RE et NG-Ex ($P < 0,05$)

FIGURE 4.2 : Production de glucose suite à une infusion de glucagon chez des rats ayant des réserves de glycogène normales (NG) ou élevées (HG) et ayant fait de l'exercice (Ex) ou au repos (Re). Adaptée de : Bonjorn et col., 2001.

4.4 Mécanismes régulateurs

Lors du présent projet de recherche, nous avons observé une augmentation importante et significative de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon. En se basant sur ce qui est disponible dans la littérature, les trois principales options pouvant expliquer la hausse des récepteurs au glucagon sont : 1) une augmentation de la synthèse du récepteur et/ou 2) une translocation des récepteurs à partir d'un «pool» intracellulaire

vers la membrane plasmique des hépatocytes et/ou 3) une activation des récepteurs inactifs.

Certaines études ont montré que différents régulateurs tels que le glucose, l'AMPc et l'oxygène peuvent induire une hausse de la synthèse du récepteur au glucagon se traduisant par une augmentation de l'ARNm associé au récepteur (1, 12, 41). Parmi ces éléments, seul le glucose a été mesuré lors du présent projet mais aucune variation significative de la glycémie n'a été enregistré suite au jeûne ou à l'exercice. Par contre, l'augmentation de l'ARNm associé aux récepteurs hépatiques au glucagon en situation de jeûne est en relation avec l'augmentation de la densité des récepteurs observée lors du présent projet. En effet, le groupe jeûne a vu la densité de ses récepteurs hépatiques au glucagon augmenté de 159 % alors que Burcelin et col. (12) ont observé une augmentation de 450 % de l'ARNm codant pour le récepteur hépatique au glucagon suite à un jeûne de 48 heures.

Dans notre étude, le délai pour la synthèse et l'exposition du récepteur au glucagon est de courte durée, soit 24 heures pour le jeûne et 180 minutes pour l'exercice. Il existe dans la littérature des données où la hausse de synthèse de récepteurs se fait sur une courte période. Kronen et col. (41) et Burcelin et col. (12) ont observé une hausse de la quantité d'ARNm associé au récepteur au glucagon incubé en présence de glucose à l'intérieur d'une période de 4 et 5 heures respectivement. Cependant, selon Yoo-Warren et col. (87), le niveau d'ARNm ne correspond pas nécessairement à la quantité de récepteurs exposés à la surface cellulaire. Les résultats de leur étude montrent que le nombre de récepteurs au glucagon est plus grand chez les animaux diabétiques comparativement aux animaux contrôles et ce, malgré des niveaux d'ARNm associés aux récepteurs au glucagon similaires dans les deux groupes d'animaux. Ils concluent donc que les changements post-traductionnels pourraient être parmi les mécanismes régulateurs importants de la disponibilité des récepteurs au glucagon.

La translocation du récepteur au glucagon à partir d'un pool de membranes intracellulaires vers la membrane plasmique est également une voie pouvant expliquer

la hausse de la densité des récepteurs au glucagon observée suite au jeûne ou à l'exercice lors du présent projet (88). L'internalisation et l'endocytose de plusieurs récepteurs hépatiques (20) ont été démontrées pour les récepteurs à l'angiotensine II (54), l'insuline (15) et le glucagon (5). Suivant l'internalisation des récepteurs hépatiques au glucagon, les résultats de l'équipe d'Authier et col. (5) indiquent une baisse de l'ordre de 20 % des récepteurs au glucagon à la surface cellulaire suite à une stimulation au glucagon aussi rapide que 24 minutes. De plus, les résultats de cette étude indiquent également une hausse de 300 % du nombre de récepteurs au glucagon dans les membranes intracellulaires et ce sans changement du nombre total de récepteurs au glucagon. À partir de leurs résultats, Authier et col. conclurent que le récepteur hépatique au glucagon peut d'une manière rapide, spécifique et réversible être internalisé et modifier sa distribution cellulaire. Cependant, aucune donnée sur l'externalisation des récepteurs au glucagon n'est disponible à ce jour.

Avec l'exercice, aucune donnée n'est actuellement disponible sur la modulation des récepteurs au niveau hépatique. Cependant, au niveau musculaire, diverses protéines impliquées dans le métabolisme glucidique, tel le GLUT4, sont reconnues pour leur activité de translocation à l'exercice (28, 38). Suite à une période d'exercice de 45 à 60 minutes, la quantité de transporteur GLUT4 à la surface de cellules musculaires augmente de façon significative sans toutefois entraîner de modifications au niveau de la quantité totale de GLUT4 (38). Les résultats rapportés lors de la présente étude concernant l'augmentation rapide de la densité des récepteurs au glucagon à l'exercice suggèrent un mécanisme de translocation qui demeure à investiguer.

Un autre phénomène pourrait en théorie expliquer l'augmentation rapide des récepteurs hépatiques au glucagon à la surface cellulaire est la présence de récepteurs non actifs au niveau de la membrane plasmique. Cependant, à ce jour, aucune étude évoque la possibilité d'une telle situation concernant les récepteurs hépatiques au glucagon.

Bien que la hausse de la densité des récepteurs au glucagon suite à une période de jeûne ou d'exercice est maintenant connue, il importe d'identifier, du moins en partie, les agents régulateurs pouvant être responsables d'un tel changement.

Le récepteur hépatique au glucagon, comme la plupart des récepteurs peut être régulé par la concentration de son ligand. Tel que mentionné auparavant, Authier et col. (5) ont observé une baisse de la disponibilité des récepteurs au glucagon à la surface cellulaire suite à une augmentation de la concentration de son ligand dans le milieu chez des foies de rats sains et sédentaires. Les résultats obtenus lors du présent projet font état d'une augmentation de la quantité du récepteur associé avec une augmentation de la concentration du glucagon chez des rats à jeun ou à l'exercice. Ces résultats indiquent qu'une période de jeûne ou d'exercice induit des changements physiologiques impliquant des régulateurs des récepteurs au glucagon autres que la seule concentration du glucagon.

La quantité de glucose est également un élément ayant une action de régulation connue sur les récepteurs au glucagon. Selon la littérature, une augmentation de la concentration de glucose entraîne une augmentation de la quantité des récepteurs (1, 12, 41). Cependant, puisque dans notre étude, les animaux sains ne subissent pas de changement significatif de la glycémie suite à 24 heures de jeûne ou suite à 180 minutes d'exercice, le glucose, à ce stade, ne peut être considéré comme un agent de régulation actif expliquant la hausse des récepteurs observée lors de cette étude. Parmi les agents susceptibles d'agir en tant que régulateurs, se retrouve la quantité de glycogène hépatique. Selon Kabadi et col. (36), la sécrétion de glucagon serait inversement proportionnelle au niveau des réserves de glycogène hépatique. Malheureusement, il n'existe pas à ce jour d'études montrant une corrélation entre la concentration de glycogène et de récepteurs au glucagon au niveau du foie. L'influence des réserves glycogéniques dans le jeûne et l'exercice, sur la régulation des récepteurs au glucagon demeure à investiguer.

Même si la littérature ne fait pas mention de cette possibilité, la concentration de l'hormone contre-régulatrice principale, soit l'insuline, pourrait également jouer un rôle dans la régulation des récepteurs au glucagon. Il est bien connu que la stimulation de la PHG par le glucagon est potentialisée par une diminution de l'insuline (31). De manière à vérifier cette hypothèse, un système de verrouillage permettant le contrôle des paramètres physiologiques et la variation de la concentration d'insuline est actuellement en cours dans notre laboratoire. Une étude impliquant des animaux diabétiques pourrait également servir à identifier le rôle de l'insuline sur les récepteurs au glucagon.

À la lumière des études concernant la régulation du récepteur au glucagon, il s'avère prépondérant que la régulation du récepteur ne peut être sous l'influence d'un seul agent mais répond plutôt à une multitude de facteurs intervenant dans l'atteinte ou le maintien de l'homéostasie glucidique.

4.5 Perspectives de recherche

De manière à bien identifier si le phénomène de translocation est responsable de l'augmentation de la densité des récepteurs au glucagon observée lors du présent projet, il importe, dans un premier temps, de différencier les membranes et organelles cellulaires en utilisant les techniques appropriées de centrifugation différentielle par affinité (60). Par la suite, la quantification des récepteurs peut se faire soit par immunobuvardage de type Western ou par une épreuve de radiolisation des récepteurs dans les différentes fractions.

La modulation du récepteur au glucagon observée dans le cadre de la présente étude génère plusieurs interrogations. Afin de quantifier l'ARNm associé aux récepteurs au glucagon des hépatocytes des animaux de nos différents groupes expérimentaux, il serait intéressant de réaliser la technique de RT-PCR (« reverse transcriptase – polymerase chain reaction »).

En se basant sur la littérature, il semble y avoir un intérêt croissant sur le rôle joué par le glucagon dans le maintien d'une normoglycémie. La concentration de glucagon ou le ratio glucagon/insuline est souvent trop élevé chez les gens et les animaux diabétiques (75, 76). Cette hyperglucagonémie serait en partie responsable des situations d'hyperglycémies (68). La découverte d'antagonistes au glucagon, représente donc une nouvelle avenue dans le traitement et la prévention du diabète (42).

Pendant les deux dernières décennies, des progrès significatifs ont été accomplis concernant la fonction biologique du glucagon, en passant par la régulation de l'expression et de la sécrétion de l'hormone, de l'interaction du glucagon avec son récepteur couplé à une protéine G (56). L'implication du glucagon dans le processus de sécrétion de l'insuline (39), son expression dans une multitude de tissus (18, 26, 73) et sa capacité de faire varier les concentrations intracellulaires de calcium/phosphatidylinositol et d'AMPc via un seul type de récepteur (34, 51) sont tous des découvertes qui renforcent l'intérêt à mieux comprendre ces mécanismes d'actions dans différentes situations physiologiques.

4.6 Conclusion

Une période de jeûne de 24 heures ou d'exercice de 180 minutes induit chez des rats sains une augmentation de l'ordre de 159 et 165 % respectivement de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon. Au niveau de l'affinité des récepteurs, le jeûne est accompagné d'une diminution de l'affinité de 40 % alors qu'aucun changement significatif n'a été observé suite à l'exercice. Ces résultats indiquent : 1) que le récepteur au glucagon possède une grande plasticité et son nombre peut être modulé rapidement, 2) que la hausse de la sensibilité au glucagon observée chez des animaux suite à une seule période d'exercice provient, du moins en partie, de la hausse de la densité des récepteurs au glucagon.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abrahamsen, N., Lundgren, K., Nishimura, E. (1995) "Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP", *J. Biol. Chem.* 270: 15853-15857.
2. Ahlborg, G., Felig, P. (1982) "Lactate and glucose exchange across the forearm, legs, and splanchnic bed during and after prolonged leg exercise", *J. Clin. Invest.* 69: 45-54.
3. Alford, F.P., Bloom, S.R., Nabarro, J.D., Hall, R., Besser, G.M., Coy, D.H., Kastin, A.J., Schally, A.J. (1974) "Glucagon control of fasting glucose in man", *Lancet* 26: 974-977.
4. Aranda, A., Herrera, E. (1974) "The effect of food deprivation on in vivo gluconeogenesis in the suckling rat", *Horm. Metab. Res.* 6: 381-385.
5. Authier, F., Desbuquois, B., De Galle, B. (1992) "Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver", *Endocrinology* 131: 447-456.
6. Bavenholm, P.N., Pigon, J., Ostenson, C.G., Efendic, S. (2001) "Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance" *Diabetes.* 50: 1449-1454.
7. Beck-Nielsen, H., Hother-Nielsen, O., Staehr, P., (2002) "Is hepatic glucose production increased in type 2 diabetes mellitus?", *Curr. Diab. Rep.* 2: 231-236.
8. Bernard, S.F., Thil, M.A., Groscolas, R., (2003) "Lipolytic and metabolic response to glucagon in fasting king penguins: phase II vs. phase III", *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R444-R454.
9. Bonjorn, V.M., Latour, M.G., Bélanger, P., Lavoie, J.M. (2002) "Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagons", *J. Appl. Physiol.* 92: 188-194.
10. Bradley, D.C., Bergman, R.N. (1992) "Hepatic glucagon sensitivity and fasting glucose concentration in normal dogs", *Am. J. Physiol.* 262:E539-E545.
11. Brand, C.L., Jorgensen, P.N., Knigge, U., Warberg, J., Svendsen, I., Kristensen, J.S., Holst, J.J., (1995) "Role of glucagon in maintenance of euglycemia in fed and fasted rats", *Am. J. Physiol.* 269: E469-E477.
12. Burcelin, R., Mrejens, C., Decaux, J.F., De Mouzon, S.H., Girard, J., Charron, M.J., (1998) "In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism", *J. Biol. Chem.* 273: 8088-8093.

13. Corssmit, E.P., Romijn, J.A., Sauerwein, H.P., (2001) "Review article: Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review", *Metabolism* 50: 742-745.
14. Cryer, P.E., (2002) "Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes", *Diabetologia* 45: 937-948.
15. Desbuquois, B., Willeput, J., Huet de Froberville, A., (1979) "Receptor-mediated internalisation of insulin in intact rat liver. A biochemical study", *FEBS Lett.* 106: 338-344.
16. Drouin, R., Lavoie, C., Ducros, F., Bourque, J., Poisson, D., Chiasson, J.L., (1998) "Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects", *Am. J. Physiol.* 274: E23-E28.
17. Drouin, R., Robert, G., Milot, M., Massicotte, D., Peronnet, F., Lavoie, C., (2004) "Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats", *Metabolism* 53: 1027-1031.
18. Dunphy, J.L., Taylor, R.G., Fuller, P.J., (1998) "Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression", *Mol. Cell. Endocrinol.* 141: 179-186.
19. Felig, P., Wahren, J., Sherwin, R., Hendler, R., (1976) "Insulin, glucagon, and somatostatin in normal physiology and diabetes mellitus", *Diabetes* 25: 1091-1099.
20. Ferguson, S.S., (2001) "Evolving concept in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor Desensitization and signaling", *Pharmacol. Rev.* 53: 1-24.
21. Fouchereau-Perron, M., Rancon, F., Freychet, P., Rosselin, G., (1976) "Effect of feeding and fasting on the early steps of glucagon action in isolated rat liver cells." *Endocrinology* 98: 755-760.
22. Frandsen, E.K., Thim, L., Moody, A.J., Markussen, J., (1985) "Structure function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21)", *J. Biol. Chem.* 260: 7581-7584.
23. Friman, G., Ilback, N.G., Crawford, D.J., Neufeld, H.A., (1991) "Metabolic responses to swimming exercise in *Streptococcus pneumoniae* infected rats", *Med. Sci. Sports. Exerc.* 23: 415-421.
24. Guignot, L., Mithieux, G. (1999) "Mechanisms by which insulin, associated or not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat" *Am. J. Physiol.* 277: E984-E989.

25. Gursoy, E., Cardounel, A., Hu, Y., Kalimi M., (2001) "Biological effects of long-term caloric restriction: adaptation with simultaneous administration of caloric stress plus repeated immobilization stress in rats" *Exp. Biol. Med.* 226: 97-102.
26. Hansen, L.H., Abrahamsen, N., Nishimura, E., (1995) "Glucagon receptor mRNA distribution in rat tissues", *Peptides* 16: 1163-1166.
27. Hendrick, G.K., Wasseman, D.H., Frizzell, R.T., Williams, P.E., Lacy, D.B., Jaspan, J.B., Cherrington, A.D., (1992) "Importance of basal glucagon in maintaining hepatic glucose production during a prolonged fast in conscious dogs", *Am. J. Physiol.* 263: E541-E549.
28. Hirshman, M.F., Wallberg-Henriksson, H., Wardzala, L.J., Horton, E.D., Horton, E.S., (1988) "Acute exercise increases the number of plasma membrane glucose transporters in rat skeletal muscle", *FEBS Lett.* 238: 235-239.
29. Hojlund, K., Wildner-Christensen, M., Eshoj, O., Skjaerbaek, C., Holst, J.J., Koldkjaer, O., Moller Jensen, D., Beck-Nielsen, H., (2001) "Reference intervals for glucose, beta-cell polypeptides, and counterregulatory factors during prolonged fasting", *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: E50-58.
30. Houston, M.E. (2001) "Biochemistry Primer for Exercise Science", second edition, Human Kinetics, Champaign, U.S.A., pp. 103-108.
31. Igawa, K., Mugavero, M., Shiota, M., Neal, D.W., Cherrington, A.D., (2002) "Insulin sensitively controls the glucagon response to mild hypoglycemia in the dog", *Diabetes* 51: 3033-3042.
32. Irwin, D.M. (2001) "Molecular evolution of proglucagon", *Regul. Pept.* 98: 1-12.
33. Iyengar, R., Herberg, J.T., Rich, K.A., (1984) "Characterization of the hepatic glucagon receptor", *J. Recept. Res.* 4:247-265.
34. Jelinek, L.J., Lok, S., Rosenberg, G.B., Smith, R.A., Grant, F.J., Biggs, S., Bensch, P.A., Kuijper, J.L., Sheppard, P.O., Sprecher, C.A., (1993) "Expression cloning and signalling properties of the rat glucagons receptor", *Science* 259: 1614-1616.
35. Johnson, M.E., Das, N.M., Butcher, F.R., Fain, J.N., (1972) "The regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by glucagon, insulin, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, and fatty acids", *J. Biol. Chem.* 247:3229-3235.
36. Kabadi, U.M., (1992) "Is hepatic glycogen content a regulator of glucagon secretion?" *Metabolism* 41: 113-115.
37. Katz, J., Tayek, J.A., (1998) "Gluconeogenesis and the cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans", *Am. J. physiol.* 275:E537-E542.

38. Kennedy, J.W., Hirshman, M.F., Gervino, E.V., Ocel, J.V., Forse, R.A., Hoenig, S.J., Aronson, D., Goodyear, L.J., Horton, E.S., (1999) "Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes", *Diabetes* 48: 1192-1197.
39. Kofod, H., Andreu, D., Thams, P., Merrifield, R.B., Hedekov, C.J., Hansen, B., Lernmark, A., (1988) "Insulin release by glucagon and secretin: studies with secretin-glucagon hybrids." *Am. J. Physiol.* 254: E454-458.
40. Koubi, H. Freminet, A., (1985) "Comparison of glycogen stores in 3- and 7-month-old lean and obese Zucker rats under fed and fasted conditions", *Comp. Biochem. Physiol.* 81:103-110.
41. Krones, A., Kietzmann, T., Jungermann, K, (1998) "Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures", *FEBS Lett.* 421: 136-140.
42. Ladouceur, G.H., Cook, J.H., Doherty, E.M., Schoen, W.R., MacDougall, M.L., Livingston, J.N., (2002) "Discovery of 5-hydroxyalkyl-4-phenylpyridines as a new class of glucagon receptor antagonists." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 461-464.
43. Landau, B.R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schuman, W.C., Ekberg, K., Kalhan, S.C., (1996) "Contribution of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state", *J. Clin. Invest.* 98: 378-385.
44. Lavoie, C., Ducros, F., Bourque, J., Langelier, H., Chiasson, J.L., (1997) "Glucose metabolism during exercise in man : the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 5: 26-35.
45. Légaré, A., Drouin, R., Milot, M., Massicotte, D., Péronnet, F., Massicotte, G., Lavoie, C., (2001) "Increased density of glucagon receptor in liver from endurance trained rats", *Am. J. Physiol.* 280: E193-E196.
46. Liljenquist, J.E., Mueller, G.L., Cherrington, A.D., Keller, U., Chiasson, J-L., Perry, J.M., Lacy, W.W., Rabinowitz, D., (1977) " Evidence for an important role of glucagon in the regulation of hepatic glucose production in normal man", *J. Clin. Invest.* 59: 369-374.
47. Ljungqvist, O., Khan, A., Ware, J., (1989) " Evidence of increased gluconeogenesis during hemorrhage in fed and 24-hour food-deprived rats", *J. Trauma.* 29: 87-90.
48. Lok, S., Kuijper, J.L., Jelinek, L.J., Kramer, J.M., Whitmore, T.E., Sprecher, C.A., Mathewes, S., Grant, F.J., Biggs, S.H., Rosenberg, G.B., (1994) "The human

- glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization", *Gene* 25: 203-209.
49. Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Mastudaira, Darnel, (1997) "Biologie moléculaire de la cellule" DeBoeck Université, 859 p.
 50. Lopez, L.C., Li, W.H., Frazier, M.L., Luo, C.C., Saunders, G.F. (1984) " Evolution of glucagon genes" *Mol. Biol. Evol.* 1 : 335-344.
 51. MacNeil, D.J., Occi, J.L., Hey, P.J., Strader, C.D., Graziano, M.P., (1994) "Cloning and expression of a human glucagon receptor" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198 :328-334.
 52. Mayo, K.E., Miller, L.J., Bataille, D., Dalle, S., Goke, B., Thorens, B., Drucker, D.J., (2003) "International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family", *Pharmacol. Rev.* 55: 167-194.
 53. McKiddie, M.T., Buchanan, K.D., Hunter, I.A., (1969) " Plasma insulin studies in two hundred patients with diabetes mellitus. " *Q. J. Med.* 38: 445-465.
 54. Montiel, M., Caro, M.C., Jimenez, E., (1997) "Agonist-induced internalisation of the angiotensin II-binding sites from plasma membranes of isolated rat hepatocytes", *J. Endocrinol.* 152: 407-412.
 55. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2002) " Biochimie de Harper" De Boeck, Bruxelles, Belgique, pp 208-218.
 56. Moore, M.C., Conolly, C.C., Cherrington, A.D. (1998) "Autoregulation of hepatic glucose production" *Eur. J. Endocrinol.* 138: 240-248.
 57. Nakagawa, S., Nakayama, H., Sasaki, T., Yoshino, K., Yu, Y.Y., (1973) "A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients" *Diabetes*, 22: 590-600.
 58. Nieto, J.L., Diaz-Laviada, I., Guillen, A., Haro, A., (1996) "Effect of endurance physical training on rat liver adenylyl cyclase system", *Cell. Signal.* 8: 317-322.
 59. Nishino, T., Kodaira, T., Shin, S., Imagawa, K., Shima, K., Kumahara, Y., Yanaihara, C., Yanaihara, N., (1981) "Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment" *Clin. Chem.* 27: 1690-1697.
 60. Ouhtit, A., Ronsin, B., Kelly, P.A., Morel, G., (1994) "Ultrastructural expression of prolactin receptor in rat liver", *Biol. Cell.* 82: 169-176.

- 61.Parilla, R., Jimenez, I., Ayuso-Parilla, M.S., (1975) "Glucagon and insulin control of gluconeogenesis in the perfused isolated rat liver. Effects on cellular metabolite distribution", *Eur. J. Biochem.* 56: 375-383.
- 62.Passoneau, J.V., Lauderdale, V.R., (1974) "A comparaisn of three methods of glycogen measurements in tissues", *Anal. Biochem.* 60: 405-412.
- 63.Persson, A. Jergil, B., (1992) "Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning", *Anal. Biochem.* 204: 131-136.
- 64.Petersen, O.H., Bear, C., (1986) "Two glucagon transducing systems", *Nature* 323: 6083.
- 65.Rao, R.H., (1995) "Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagons", *Metabolism* 44:817-824.
- 66.Rothman, D.L., Magnusson, I., Katz, L.D., Schulman, R.G., Schulman, G.I., (1991) "Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR", *Science* 254: 573-576.
- 67.Rojas, F.J., Swartz, T.L., Iyengar, R., Garber, A.J., Birnbauer, L., (1983) "Monoiodoglucagon: synthesis, purification by high pressure liquid chromatography, and characteristics a receptor probe." *Endocrinology* 113: 711-713.
- 68.Shah, P., Vella, A., Basu, R., Schwnk, W.F., Rizza, R.A., (2000) "Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 4053-4059.
- 69.Sivarajah, P., Wheeler, M.B., Irwin, D.M., (2001) "Evolution of receptors for proglucagon-derived peptides: isolation of frog glucagon receptors", *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 128: 517-527.
- 70.Sonne, B., Mikines, K.J., Galbo, H., (1987) "Glucose turnover in 48-hour-fasted running rats", *Am. J. Physiol.* 252: R587-R593.
- 71.Soskin, S., Essex, H.E., Herrick, J.F., Mann, F.C., (1938) "The mechanism of the regulation of blood sugar by the liver", *American Journal of Physiology* 124: 558-567.
72. Stumvoll, M., Meyer, C., Mitrakou, A., Gerich, J.E., (1999) " Important role of the kidney in human carbohydrate metabolism", *Med. Hypotheses* 52: 363-366.
- 73.Svoboda, M., Tastenoy, M., Vertongen, P., Robberech,t P., (1994) "Relative quantitative analysis of glucagon receptor mRNA in rat tissues", *Mol. Cell. Endocrinol.* 105: 131-137.

74. Teillet, L., Ribiere, P., Gouraud, S., Bakala, H., Corman, B., (2002) "Cellular signaling, AGE accumulation and gene expression in hepatocytes of lean aging rats fed ad libitum or food-restricted", *Mech. Ageing Dev.* 123: 427-439.
75. Unger, R.H., (1971) "Glucagon and the insulin: glucagon ratio in diabetes and other catabolic illnesses", *Diabetes* 20:834-838.
76. Unger, R.H., (1985) "Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances" *Diabetologia*, 28: 574-578.
77. Unson, C.G., (2002) "Molecular determinants of glucagon receptor signaling", *Biopolymers* 66: 218-235.
78. Wakelam, M.J., Murphy, G.J., Hruby, V.J., Houslay, M.D., (1986) "Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon", *Nature* 323: 68-71.
79. Wang, D.A., Ji, J., Sun, Y.H., Shen, J.C., Feng, L.X., Elisseeff, J.H., (2002) "In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly(ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth. " *Biomacromolecules* 3: 1286-1295.
80. Warhen, J., Felig, P., Ahlborg, G., Jorfeldt, L., (1971) "Glucose metabolism during leg exercise in man", *J. Clin. Invest.* 50: 2715-25.
81. Wasserman, D.H., (1995) "Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state", *Annu. Rev. Physiol.* 57: 191-218.
82. Wasserman, D.H., Lacy, D.B., Bracy, D.P., (1993) "Relationship between arterial and portal vein immunoreactive glucagon during exercise", *J. Appl. Physiol.* 75: 724-729.
83. Wasserman, D.H., Spalding, J.A., Lacy, D.B., Colburn, C.A., Goldstein, R.E. Cherrington, A.D., (1989) "Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work", *Am. J. Physiol.* 257: E108-E117.
84. Waynforth, H.B., Flecknell, P.A., (1992) "Experimental and surgical technique in rat", *Academic Press, San Diego, U.S.A.*, pp. 215-222.
85. Wilmore, J.H., Costill, D.L., (1999) "Physiology of Sports and Exercise", second edition, *Human Kinetics, U.S.A.*, pp. 114-156.
86. Wright, G.L., Morrison, R., Fultz, M.E., Wright, G., Mccumbee, W., Wehner, P., Studeny, M., (2003) "Effect of fasting on vascular contractility in lean and obese Zucker rats", *Clin. Nutr.* 22: 359-363.

87. Yoo-Warren, H., Willse, A.G., Hancock, N., Hull, J., McCaleb, M., Livingston, J.N., (1994) "Regulation of rat glucagon receptor expression", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:347-53.
88. Yu, S.S., Lefkowitz, R.J., Hausdorff, W.P., (1993) "Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization", *J. Biol. Chem.* 268:337-341.